جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بابل– كلية العلوم

# دراسة التأثيرات المرضية والمناعية للذيفان الكبدي لبكتريا *Campylobacter jejuni* على الحيوانات المختبرية

**أطروحة مقدمة الى**

مجلس كلية العلوم – جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة–الأحياء مجهرية

**من قبل**

**الاء فاهم عباس الجبوري**
ماجستير احياء مجهرية– جامعة بابل

**بإشراف**

**أ.م.د. أزهار عمران الذهب**

٢٠١٢ ميلادي  ١٤٣٣ هجري

بِسمِ اللهِ الرحْمنِ الرّحَيم


**الخلاصة**

جمعت 340 عينة براز تمثلت بـ250 عينة براز مائي و٩٠ عينة براز دموي من اطفال مصابين بالإسهال تراوحت اعمارهم بين ١–٥ سنوات. جمعت هذه العينات من مستشفى بابل للولادة والاطفال ومستشفى القاسم العام في محافظة بابل في المدة من تموز ٢٠١٠ – كانون الثاني٢٠١١.

تم الحصول على ٨ عزلات (٢,٣٥%) لبكتريا *Campylobacter jejuni*، توزعت بين ٦ عزلات (2.4%) من عينات البراز المائي وعزلتين (2.2%) من عينات البراز الدموي وباستعمال طريقتين للعزل: الأولى باستخدام الوسط الانتقائي (*Campylobacter* agar) والثانية باستخدام اوراق ترشيح حجم ثقوبها 0.45 مايكروميتر. شخصت العزلات اعتماداً على خصائصها المظهرية والاختبارات الكيموحيوية، وجرى تأكيد تشخيص العزلات مصلياً بإجراء فحص تلازن اللاتكس (Latex agglutination test) باستخدام المصل الضدي الخاص ببكتريا *C. jejuni*.

تم التحري عن جين *ht*B المسـؤول عن الذيفان الكبدي (Hepatotoxin) في عزلات بكتريا *C. jejuni* باسـتخدام تقنية التفاعل السـلسـلي لانزيم بلمرة الدنا Polymerase chain reaction (PCR). اذ بينت النتائج أن عزلة واحدة فقط معزولة من حالة اسهال مائي كانت تحمل جين *ht*B. ثم استخلص الذيفان الكبدي من العزلة البكتيرية الحاوية على جين *ht*B واختبرت فعاليته باسـتخدام اختبار وظائف الكبد (Liver function test) في اناث الفئران السـويسـرية البيضـاء (Swiss mice) نوع Balb/c mice (*Mus musculus*)، اذ وجد ان الحقن الوريدي لـــ 100 مايكروغرام/ ٠,٥ مل من الذيفان الكبدي ادى الى ارتفاع معنوي في متوسـط تركيز انزيمـات الكبـد Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) و Glutamate pyruvate transaminase (GPT) في حين كانت الزيادة غير معنوية في متوسـط تركيز انزيم Alkaline phosphatase (ALP) مقارنة مع السيطرة.

تضمنت الدراسة الامراضية تحديد الجرعة المهلكة لنصف العدد $LD_{50}$ من اناث الفئران السويسرية والتي كانت $3.16 \times 10^8$ خلية/مل للعالق البكتيري و866 مايكروغرام/ مل لمستخلص الذيفان الكبدي، وقد اظهر الفحص العياني لأحشاء الفئران المحقونة بالعالق البكتيري تضخم الامعاء ورقة غشائها نتيجة تجمع السوائل وتضخم الطحال والكبد مع وجود بقع مصفرة في بعض الفصوص الكبدية، ووجد من خلال دراسة المقاطع النسيجية لأعضاء الفئران المحقونة بالعالق البكتيري ومستخلص الذيفان الكبدي، إن العالق البكتيري

كان له تأثير شديد في أنسجة الفئران (الكبد، والامعاء والطحال) مقارنة مع الذيفان الكبدي الذي كان تأثيره في الكبد أشد. تمثلت التغيرات المرضية النسيجية بحدوث الاحتقان الدموي وتجمع عدة بؤر من الخلايا الالتهابية وتنخر الكبد، أما الطحال فقد كان هنالك ضمور في منطقة اللب الأبيض وتوسع منطقة اللب الأحمر فضلاً عن وجود النزف الدموي. وفي الامعاء الدقيقة تمثلت التغيرات النسيجية بتوسف وسقوط الزغابات في التجويف المعوي وارتشاح الخلايا الالتهابية كما لوحظ ضمور الزغابات.

حضرت مستضدات بكتريا *C. jejuni* (المستضد المقتول بالحرارة وعديد السكريد الشحمي والذيفان الكبدي)، وتم تمنيع الارانب المحلية *(Oryctologus cuniculus)* بهذه المستضدات فضلاً عن استخدام المساعد المناعي فروند الكامل Complete Freunds' adjuvant (CFA)، وبعد انتهاء مدة التمنيع جمع الدم واخذت اجزاء من الامعاء ثم حددت بعض معايير الاستجابة المناعية الموضعية والجهازية (الخلوية والخلطية) في ارانب الاختبار الممنعة بمستضدات البكتريا والسيطرة الممنعة بالمحلول الملحي الطبيعي.

بينت النتائج وجود ارتفاع معنوي في مستويات الاستجابة المناعية الخلوية الموضعية والجهازية والتي حددت باستخدام اختبار التشكل الزهري التائي، واختبار الفعالية البلعمية واختبار عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في ارانب الاختبار مقارنة مع السيطرة، كما وجد ان الاستجابة المناعية الخلوية الموضعية اعلى من الجهازية. اما الاستجابة المناعية الخلطية الموضعية والجهازية والتي تم تحديدها باستخدام فحص التلازن المباشر بالأنابيب والتلازن الدموي المنفعل فقد لوحظ وجود ارتفاع معنوي في المستضدية الجهازية والموضعية مقارنة مع السيطرة.

تم تقدير تركيز الاضداد النوعية IgG و IgA المتخصصة ببكتريا *C. jejuni* وتركيز الحركيات الخلوية IL-8 و IL-12 في امصال ارانب الاختبار والسيطرة باستخدام تقنية الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). اظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في متوسط تركيز الاضداد المناعية IgG و IgA في امصال الارانب الممنعة بالمستضد المقتول ومستضد عديد السكريد الشحمي عند المقارنة مع السيطرة. في حين كانت الزيادة غير معنوية في متوسط تركيز هذه الاضداد في امصال الارانب الممنعة بمستضد الذيفان الكبدي. كما اظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي في تركيز الحركيات الخلوية في مجاميع ارانب الاختبار مقارنة مع السيطرة.

**قائمة المحتويات**

| التسلسل | الموضوع | الصفحة |
|---|---|---|
| | الخلاصة | I |
| | قائمة المحتويات | III |
| | قائمة الأشكال | XI |
| | قائمة الجداول | XIII |
| | قائمة المختصرات | XIV |
| | **الفصل الأول : المقدمة** | |
| 1- | المقدمة | 1 |
| | **الفصل الثاني : استعراض المراجع** | |
| 1-2 | نبذة تاريخية عن عزل بكتريا *Campylobacter* | 4 |
| 2-2 | تصنيف بكتريا *Campylobacter* | 5 |
| 3-2 | الصفات العامة لبكتريا *C. jejuni* | 6 |
| 4-2 | التشخيص المختبري لبكتريا *C. jejuni* | 8 |
| 5-2 | انتقال وانتشار بكتريا *C. jejuni* | 10 |
| 6-2 | الوبائية Epidemiology | 12 |
| 7-2 | الاعراض السريرية | ١٢ |
| ٢-8 | مضاعفات خارج الامعاء Extra- intestinal complications | ١3 |
| ٢-9 | عوامل الضراوة Virulence factors | ١5 |
| 2-9-1 | الاسواط Flagella | ١5 |
| 2-9-2 | المحفظة Capsule | ١٥ |
| 2-9-3 | بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins | ١6 |
| 2-9-4 | عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide | ١7 |
| ٢-٩-٥ | الذيفانات Toxins | ١9 |
| ٢-٩-٥-١ | الذيفانات المعوية Enterotoxins | ١٩ |
| ٢-٩-٥-٢ | الذيفانات الخلوية Cytotoxins | 20 |

| | | |
|---|---|---|
| ٢-٩-٦ | استهلاك الحديد Iron utilizing | 21 |
| ٢-٩-٧ | بلازميد الضراوة Virulence plasmid (p. vir) | 22 |
| 8-9-2 | مستضدات الغزو *Campylobacter* invasive antigens | 22 |
| 10-2 | قابلية بكتريا *C. jejuni* على دخول واستيطان والبقاء داخل خلايا المضيف | 22 |
| 11-2 | الاستجابة المناعية لبكتريا *C. jejuni* | 27 |
| 1-11-2 | المناعة العفوية Innate immunity | 27 |
| 2-11-2 | المناعة الخلطية Humoral immunity | 30 |
| 3-11-2 | المناعة الخلوية Cellular immunity | 32 |
| 12-2 | إمراضية بكتريا *C. jejuni* في حيوان المختبر | 34 |
| | **الفصل الثالث : المواد وطرق العمل** | |
| 1-3 | المواد | 36 |
| 1-1-3 | الاجهزة والادوات | 36 |
| 2-1-3 | المواد الكيميائية | ٣٧ |
| ٣-١-٣ | الاوساط الزرعية | 3٩ |
| 1-3-1-3 | أوساط العزل الأولي لبكتريا *C. jejuni* | ٣٩ |
| 1-1-3-1-3 | وسط اغار الكمبيلوبكتر | ٣٩ |
| ٢-١-٣-١-٣ | وسط اغار الجكليت | ٣٩ |
| 2-3-1-3 | أوساط التنقية والإدامة والحفظ | 40 |
| 3-1-3-3 | اوساط تشخيص البكتريا | ٤٠ |
| 1-3-3-1-3 | وسط مرق البروسيلا | ٤٠ |
| 2-3-3-1-3 | وسط مرق نقيع القلب والدماغ | ٤٠ |
| 3-3-3-1-3 | وسط اغار الماكونكي | ٤٠ |
| ٤-٣-٣-١-٣ | وسط اغار ثلاثي السكر والحديد | ٤٠ |
| ٥-٣-٣-١-٣ | وسط اختزال النترات | ٤١ |
| ٦-٣-٣-١-٣ | وسط اغار اليوريا | ٤١ |

| | | |
|---|---|---|
| ٣-١-٣-٣-٧ | وسط اختبار تحلل الهيبيوررات | ٤١ |
| ٣-١-٣-٣-٨ | وسط اختبار الحركة | ٤١ |
| ٣-١-٣-٣-٩ | وسط اغار مولر–هنتون | ٤١ |
| ٣-١-٣-٣-١٠ | وسط مرق لوريا برتاني السائل | ٤٢ |
| ٣-١-٣-٤ | اوساط انتاج الذيفان | ٤٢ |
| ٣-١-٣-٤-١ | وسط انتاج الذيفان الكبدي | ٤٢ |
| ٣-١-٣-٤-٢ | وسط انتاج عديد السكريد الشحمي | ٤٢ |
| ٣-١-٤ | الاوساط المناعية | ٤٢ |
| ٣-١-٤-١ | وسط اغار–اغار | ٤٢ |
| ٣-١-٤-٢ | وسط الايكل الاساس | ٤٢ |
| ٣-١-٥ | االصبغات والكواشف | ٤٢ |
| ٣-١-٥-١ | صبغة غرام | ٤٢ |
| ٣-١-٥-٢ | صبغة الايوسين والهيماتوكسلين | ٤٣ |
| ٣-١-٥-٣ | صبغة نايتروبلوتترازوليوم | 4٣ |
| ٣-١-٥-٤ | صبغة رايت | ٤٣ |
| ٣-١-٥-٥ | كاشف الكاتليز | ٤٣ |
| ٣-١-٥-٦ | كاشف الاوكسيديز | ٤٣ |
| ٣-١-٥-٧ | كاشف النتهايدرين | ٤٣ |
| ٣-١-٥-٨ | كاشف اختزال النترات | ٤٣ |
| ٣-١-٦ | المحاليل والدوارئ | ٤٤ |
| ٣-١-٦-١ | المحاليل المستخدمة في عزل بكتريا *C. jejuni* | ٤٤ |
| ٣-١-٦-١-١ | محلول دارئ الفوسفات | ٤٤ |
| ٣-١-٦-١-٢ | محلول مكفرلاند | ٤٤ |
| ٣-١-٦-١-٣ | المحلول الملحي الفورماليني ١٠% | ٤٤ |
| ٣-١-٦-٢ | المحاليل المستخدمة في تقنية التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا PCR | ٤٤ |

| | | |
|---|---|---|
| ٣-١-٦-٢-١ | المحاليل المستخدمة في استخلاص الدنا | ٤٤ |
| 2-2-6-1-3 | المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي | ٤٥ |
| ٣-١-٦-٣ | المحاليل المستخدمة في استخلاص الذيفان الكبدي | ٤٥ |
| ٣-١-٦-٤ | المحاليل المستخدمة في وسط انتاج عديد السكريد الشحمي | ٤٦ |
| ٣-١-٦-٥ | المحاليل المستخدمة في تقدير كمية البروتين | ٤٦ |
| ٢-١-٦-٦ | المحاليل المستخدمة في تقدير كمية الكاربوهيدرات | 46 |
| ٣-١-٦-٧ | المحاليل المناعية | 4٧ |
| 1-7-6-1-3 | المحلول الملحي الطبيعي | 47 |
| 2-7-6-1-3 | المحلول الملحي الفورماليني ٠,٥% | ٤٧ |
| ٣-١-٦-٧-٣ | دارئ الترس القاعدي | ٤٧ |
| ٣-١-٦-٧-٤ | محلول الكلايكول متعدد الاثيلين | ٤٧ |
| ٣-١-٦-٧-٥ | محلول السيفر | ٤٧ |
| ٣-١-٦-٧-٦ | محلول دارئ هيبس الملحي | ٤٨ |
| ٣-١-٦-٧-٧ | محلول الدكستران (٦%) | ٤8 |
| ٣-١-٦-٧-٨ | محلول حامض التانيك | ٤8 |
| ٣-١-٦-٧-٩ | محلول عزل الخلايا اللمفاوية | 48 |
| ٣-١-٦-٧-١٠ | كريات الدم الحمر للخراف | ٤٨ |
| ٣-١-٧ | الحيوانات المختبرية | ٤٨ |
| ٣-٢ | طرائق العمل | ٤9 |
| ٣-٢-١ | جمع العينات | ٤9 |
| ٣-٢-٢ | التشخيص المختبري | ٤٩ |
| ٣-٢-٢-١ | الفحص العياني للبراز | ٤٩ |
| ٣-٢-٢-٢ | التصبيغ المباشر | ٤٩ |
| ٣-٢-٢-٣ | زرع العينات | ٤٩ |
| ٣-٢-٢-٤ | الخصائص المظهرية | ٥٠ |

| | | |
|---|---|---|
| ٣-٢-٢-٥ | الاختبارات الكيموحيوية | ٥٠ |
| ٣-٢-٢-٥-١ | اختبار الاوكسيديز | 50 |
| ٣-٢-٢-٥-٢ | اختبار الكاتليز | ٥٠ |
| ٣-٢-٢-٥-٣ | اختبار اليوريز | ٥٠ |
| ٣-٢-٢-٥-٤ | اختبار تحلل الهيبيورات | ٥٠ |
| ٣-٢-٢-٥-٥ | اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز وكبريتيد الهيدروجين | ٥١ |
| ٣-٢-٢-٥-٦ | اختبار النمو في درجات الحرارة 25، 37 و 42 م° | ٥١ |
| ٣-٢-٢-٥-٧ | اختبار اختزال النترات | ٥١ |
| ٣-٢-٢-٥-٨ | اختبار تحمل الملوحة | ٥١ |
| ٣-٢-٢-٥-٩ | النمو على اغار الماكونكي | 51 |
| ٣-٢-٢-٥-10 | اختبار الحركة | ٥١ |
| ٣-٢-٢-٥-11 | اختبار الحساسية للمضادين الحيويين حامض النالدكسك Naldixic acid والسيفالوثين Cephalothin | ٥2 |
| ٣-٢-٢-٦ | التشخيص المصلي لبكتريا *C. jejuni* باستخدام Hi *Campylobacter* Latex test kit | ٥٢ |
| ٣-٢-٣ | التحري الجزيئي عن الذيفان الكبدي في عزلات بكتريا *C. jejuni* | ٥٢ |
| ٣-٢-٣-1 | استخلاص الدنا | ٥٢ |
| ٣-٢-٣-٢ | خليط تفاعل البلمرة Master mix | ٥٣ |
| 3-2-3-3 | طريقة عمل التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا | ٥٤ |
| ٣-٢-٣-٤ | الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز | ٥٥ |
| ٣-٢-٤ | تحضير الذيفان الكبدي | ٥٦ |
| ٣-٢-٤-١ | انتاج الذيفان الكبدي | ٥٦ |
| ٣-٢-٤-٢ | استخلاص الذيفان الكبدي الخام | ٥٦ |
| ٣-٢-٤-٣ | ترسيب الذيفان الكبدي بكبريتات الامونيوم | ٥٦ |
| ٣-٢-٥ | تحضير عديد السكريد الشحمي | ٥٧ |
| ٣-٢-٥-١ | استخلاص عديد السكريد الشحمي | ٥٧ |

| | | |
|---|---|---|
| ٣-٢-٥-٢ | التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي | ٥٨ |
| ٣-٢-٦ | التحليل الكيميائي للذيفان الكبدي وعديد السكريد الشحمي | 5٨ |
| 3-2-6-1 | تقدير كمية البروتينات | 5٨ |
| ٣-٢-٦-٢ | تقدير كمية الكاربوهيدرات | ٥٩ |
| ٣-٢-٧ | اختبار فعالية الذيفان الكبدي | ٦١ |
| 3-2-7 | الدراسة المرضية في الحيوان المختبري | 61 |
| ٣-٢-8-١ | تحديد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ | 6١ |
| 3-2-8-1-1 | تحديد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ لبكتريا *C. jejuni* | 6١ |
| 3-2-8-1-2 | تحديد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ للذيفان الكبدي | 62 |
| ٣-٢-8-٢ | دراسة التأثيرات المرضية لكل من العالق البكتيري والذيفان الكبدي | 62 |
| ٣-٢-9 | الدراسة المناعية في الارنب لمستضدات بكتريا *C. jejuni* | 63 |
| 3-2-9-1 | تحضير المستضدات البكتيرية | 63 |
| 3-2-9-2 | برنامج التمنيع | 64 |
| ٣-٢-9-٣ | استخلاص الضد الافرازي من الاثني عشر | 65 |
| ٣-٢-9-٤ | فصل خلايا الدم البيض من الاثني عشر | 6٦ |
| 3-2-9-5 | الاختبارات المناعية | 66 |
| ٣-٢-9-٥-١ | اختبار التلازن بالانابيب | 66 |
| 3-2-9-5-2 | تقدير تركيز الاضداد النوعية المتخصصة ببكتريا *C. jejuni* | 68 |
| 3-2-9-5-3 | اختبار النشاط البلعمي | 70 |
| ٣-٢-9-٥-٤ | اختبار التشكل الزهري | 7٠ |
| ٣-٢-9-٥-٥ | اختبار عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض | 7١ |
| ٣-٢-9-٥-٦ | تقدير تركيز الحركيات الخلوية | 72 |
| ٣-٣ | التحليل الحصائي | 7٣ |
| | **الفصل الرابع : النتائج** | |
| 4-1 | العزل | ٧٤ |

| | | |
|---|---|---|
| 2-4 | التشخيص | ٧٤ |
| 1-2-4 | التصبيغ المباشر لعينات البراز | ٧٤ |
| 2-2-4 | الفحص المزرعي لعينات البراز | ٧٥ |
| 1-2-2-4 | الوصف المزرعي للنمو على وسط العزل الاولي الانتقائي | ٧٥ |
| 2-2-2-4 | الوص المزرعي للنمو باستخدام اوراق الترشيح | ٧٦ |
| 3-2-4 | الوصف المجهري | ٧٦ |
| 4-2-4 | الاختبارات الكيموحيوية والفسيولوجية | ٧٧ |
| 5-2-4 | التشخيص المصلي لبكتريا *C. jejuni* باستخدام Hi *Campylobacter* latex test kit | ٧٨ |
| 3-4 | التحري الجزيئي عن الذيفان الكبدي في عزلات بكتريا *C. jejuni* | ٧٩ |
| 4-4 | التحليل الكيميائي للذيفان الكبدي وعديد السكريد الشحمي | ٨٠ |
| 5-4 | اختبار فعالية الذيفان الكبدي | 80 |
| 6-4 | الدراسة المرضية في الحيوان المختبري | 82 |
| 1-6-4 | الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ | 82 |
| 1-1-6-4 | تحديد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ لبكتريا *C. jejuni* | ٨٢ |
| 2-1-6-4 | تحديد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ للذيفان الكبدي | ٨٣ |
| 2-6-4 | التغيرات السريرية | ٨٤ |
| 3-6-4 | التغيرات المرضية النسيجية | ٨٦ |
| 7-4 | الدراسة المناعية في الحيوان المختبري | ٩٤ |
| 1-7-4 | المناعة الخلطية Humoral immunity | ٩٤ |
| 1-1-7-4 | المستضدية Antigenimia الجهازية والموضعية المتخصصة بمستضدات بكتريا *C. jejuni* | 94 |
| 2-1-7-4 | تركيز الاضداد النوعية IgG و IgA المتخصصة ببكتريا *C. jejuni* | 95 |
| 2-7-4 | المناعة الخلوية Cellular immunity | 96 |
| 1-2-7-4 | المناعة الخلوية غير المتخصصة Cellular nonspecific immunity | 96 |
| 1-1-2-7-4 | اختبار النشاط البلعمي Phagocytic activity test | 96 |

| | | |
|---|---|---|
| 2-1-2-7-4 | اختبار التشكل الزهري E-Rosette test | 96 |
| 2-2-7-4 | المناعة الخلوية المتخصصة | 97 |
| 1-2-2-7-4 | اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض | 97 |
| 3-7-4 | تركيز الحركيات الخلوية | 98 |
| 1-3-7-4 | تقدير تركيز الـ IL-8 | 98 |
| 2-3-7-4 | تقدير تركيز الـ IL-12 | 99 |
| | **الفصل الخامس : المناقشة** | |
| 1-5 | العزل Isolation | 100 |
| 2-5 | التشخيص Diagnosis | 101 |
| 1-2-5 | التصبيغ المباشر لعينات البراز | 101 |
| 2-2-5 | الفحص المزرعي لعينات البراز | 101 |
| 3-2-5 | الوصف المجهري | 102 |
| 4-2-5 | الاختبارات الكيموحيوية | 103 |
| 3-5 | التحري الجزيئي عن الذيفان الكبدي في عزلات بكتريا ***C. jejuni*** | 104 |
| 4-5 | استخلاص الذيفان الكبدي | 104 |
| 5-5 | اختبار فعالية الذيفان الكبدي | 105 |
| 6-5 | الدراسة المرضية في الحيوان المختبري | 105 |
| 1-6-5 | الجرعة المهلكة للنصف LD50 | 105 |
| 2-6-5 | التغيرات السريرية | 106 |
| 3-6-5 | التغيرات المرضية النسيجية | 108 |
| 7-5 | الدراسة المناعية في الحيوان المختبري | 109 |
| 1-7-5 | المناعة الخلطية Humoral immunity | 109 |
| 1-1-7-5 | المستضدية المتخصصة بمستضدات بكتريا *C. jejuni* | 109 |
| 2-1-7-5 | تركيز الاضداد النوعية المتخصصة ببكتريا *C. jejuni* | 110 |
| 2-7-5 | المناعة الخلوية Cellular immunity | 111 |

| | | |
|---|---|---|
| 1-2-7-5 | النشاط البلعمي | 111 |
| 2-2-7-5 | التشكل الزهري | 113 |
| 3-2-7-5 | عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض | 114 |
| 3-7-5 | تركيز الحركيات الخلوية | 116 |
| 1-3-7-5 | تركيز الـ IL-8 | 116 |
| 2-3-7-5 | تركيز الـ IL-12 | 117 |
| | الاستنتاجات | 119 |
| | التوصيات | 119 |
| | المصادر | 120 |
| | الخلاصة باللغة الانكليزية | |


**قائمة الأشكال**


| رقم الشكل | عنوان الشكل | الصفحة |
|---|---|---|
| ١-١ | مخطط يوضح مواضيع الدراسة | ٣ |
| ١-٢ | مصادر انتقال بكتريا *C. jejuni* الى الانسان | 11 |
| ٢-٢ | اليات دخول وانتقال بكتريا *C. jejuni* الى الخلايا الظهارية | 26 |
| ٣-٢ | تحفيز الخلايا الظهارية على انتاج الحركيات الخلوية استجابة لبكتريا *C. jejuni* | 29 |
| ١-٣ | المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري | ٥٩ |
| ٢-٣ | المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز | ٦٠ |
| ٣-٣ | منحني المعايرة القياسي لتركيز الضد النوعي IgA | 69 |
| ٤-٣ | منحني المعايرة القياسي لتركيز الضد النوعي IgG | 69 |
| ٥-٣ | منحني المعايرة القياسي لتركيز IL-8 | 73 |
| ٦-٣ | منحني المعايرة القياسي لتركيز IL-12 | 73 |
| 1-4 | مسحة براز مصبوغة بصبغة الكاربول فوكسين ١% إذ يلاحظ الشكل الحلزوني وجناح طائر النورس لبكتريا *C. jejuni* | ٧٥ |

| | | |
|---|---|---|
| 2-4 | مستعمرات نقية لبكتريا *C. jejuni* نامية على وسط اغار الدم | ٧٦ |
| 3-4 | اشكال بكتريا *C. jejuni* مصبوغة بصبغة غرام من مزرعة بعمر ٢٤ ساعة، إذ يلاحظ الشكل الحلزوني وجناح طائر النورس التكبير 1000X. | ٧٧ |
| 4-4 | الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضاعف الـ PCR لعزلات *C. jejuni* بوجود الدليل الموجب. | ٧٩ |
| 5-4 | مقطع في فأرة | ٨٥ |
| 6-4 | مقطع عرضي في الامعاء الدقيقة لفأرة بعد ثلاثة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 50X) | ٨٧ |
| 7-4 | مقطع عرضي في الامعاء الدقيقة لفأرة محقونة بـ $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 200X) | ٨٧ |
| 8-4 | مقطع عرضي في الامعاء الدقيقة لفأرة بعد سبعة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 50X). | 88 |
| 9-4 | مقطع عرضي في امعاء فأرة محقونة بالذيفان الكبدي (H&E. 50X) . | 88 |
| 10-4 | مقطع عرضي في امعاء فأرة محقونة بمحلول دارئ الفوسفات كسيطرة (H&E. 50X) | 89 |
| 11-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة بعد ثلاثة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 50X) | 89 |
| 12-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة بعد ثلاثة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 200X) | 90 |
| 13-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة بعد سبعة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 200X) | 90 |
| 14-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة محقونة بالذيفان الكبدي (H&E. 200X) | 91 |
| 15-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة محقونة بالذيفان الكبدي (H&E. 200X) | 91 |
| 16-4 | مقطع عرضي في كبد فأرة محقونة بمحلول دارئ الفوسفات كسيطرة (H&E. 100X) | 92 |

| | | |
|---|---|---|
| 17-4 | مقطع عرضي في طحال فارة بعد ثلاثة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 50X). | 92 |
| 18-4 | مقطع عرضي في طحال فأرة بعد سبعة ايام من حقن $10^8$خلية/مل من عالق بكتريا *C. jejuni* (H&E. 200X) | 93 |
| 19-4 | مقطع عرضي في طحال فأرة محقونة بالذيفان الكبدي (H&E. 200X) | 93 |


**قائمة الجداول**


| رقم الجدول | عنوان الجدول | الصفحة |
|---|---|---|
| 1-٣ | تتابع البادئ الخاص المستعمل | ٥٤ |
| 2-٣ | إحجام المواد الكيمياوية المستعملة في التفاعل | ٥٤ |
| 3-٣ | ظروف التفاعل المستخدمة في تقنية PCR | ٥٥ |
| 4-٣ | تصميم التجربة المناعية | ٦٤ |
| ١-٤ | اعداد العينات الموجبة للتصبيغ المباشر والزرع البكتيري ونسبتها المئوية | ٧٤ |
| ٢-٤ | الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *C. jejuni* | ٧٨ |
| ٣-٤ | تركيز البروتين والكاربوهيدرات في الذيفان الكبدي وعديد السكريد الشحمي | ٨٠ |
| ٤-٤ | متوسط تركيز انزيمات الكبد بوحدة IU/ml | ٨١ |
| ٥-٤ | نتائج الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ لبكتريا *C. jejuni* | ٨٣ |
| ٦-٤ | نتائج الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ للذيفان الكبدي | ٨٤ |
| ٧-٤ | متوسط عيار الاضداد الجهازية والموضعية المتخصصة بمستضدات بكتريا *C. jejuni*. | 94 |
| ٨-٤ | متوسط تركيز الاضداد النوعية IgG و IgA بوحدات (Ru/ml) | 95 |
| ٩-٤ | متوسط الفعالية البلعمية الجهازية والموضعية . | ٩٦ |
| ١٠-٤ | متوسط النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التائية الجهازية والموضعية المكونة للتشكل الزهري. | ٩٧ |
| ١١-٤ | متوسط النسبة المئوية لعامل تثبيط هجرة الخلايا البيض الجهازية والموضعية . | ٩٨ |

| | | |
|---|---|---|
| ٤-١٢ | متوسط تركيز IL-8 بوحدة (Pg/mL). | ٩٩ |
| ٤-١٣ | متوسط تركيز الـ IL-12 بوحدة (Pg/mL). | ٩٩ |


## قائمة المختصرات

| المختصر | المصطلح |
|---|---|
| AIDS | Acquired immunodeficiency syndrome |
| ALP | Alkaline phosphatase |
| AP-1 | Activating protein-1 |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| cAMP | cyclic Adenosine monophosphate |
| Caco-2 | A human colonic cell line |
| *C. jejuni* | *Campylobacter jejuni* |
| CCV | *Campylobacter* containing vacule |
| CD | Cluster of differentiation |
| CDT | Cytolethal distending toxin |
| CFA | Complete Freunds' adjuvant |
| cGMP | cyclic Guanosine Monophosphate |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| Cia | *Campylobacter* invasive antigens |
| CO | Congestion |
| CT | *Vibrio cholerae* toxin |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid |
| ELISA | Enzyme linked immuosorbent assay |
| ERK | Extracellular regulater protein |
| G2 | Growth 2 |
| G-CSF | Granulocyte colony stimulatory factor |
| GOT | Glutamate oxaloacetate transaminase |

| | |
|---|---|
| GPT | Glutamate pyruvate transaminase |
| H&E. | Hematoxylin and Eosin stain |
| HD | Hydropic degeneration |
| HeLa | Human epithelial cervical carcinoma cell |
| HEp-2 | Human laryngeal carcinoma cell |
| HEPES | 2 -hydroxyethyl piperazin-$N_2$-ethan sulfonic acid |
| Hsp 90α | Heat shock protein 90 α |
| *ht*B | Hepatotoxin |
| IF | Inflammation foci |
| IL | Interleukin |
| IFN-γ | Interferon gamma |
| INT 407 | Intestine tisuue cultur cells |
| JlpA | *jejuni* lipoprotein A |
| $LD_{50}$ | 50% Lethal dose |
| LIF | Leucocytes migration inhibition factor |
| LPS | Lipopolysaccharieds |
| LOS | Lipooligoccharieds |
| LSD | Least significant difference |
| LT | Heat labile enterotoxin |
| M | Migration |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MIF | Macrophage migration inhibition factor |
| MRC | Human lung fibroblast cells |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| NF-κB | Nuclear factor- κB |
| NK cell | Natural killer cell |
| NODs | Nucleotide-binding oligomerization domain |
| NOD-1 | Nucleotide-binding oligomerization domain-1 |
| PAMP | Pathogen-associated molecular patterns |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PEG | Polyethylene glycol |
| Pg | Picogram |
| PI3-K | Phosphotidyl inosilot -3 kinase |
| PMN | Polymorphonuclear neutrophils |

| | |
|---|---|
| PRRs | Host pattern-recognition receptors |
| RU | Relative unit |
| SDS | Sodiume dodociel sulfate |
| sIgA | secretory Immunoglobulin A |
| TGF | Transforming growth factor |
| Th | T-helper cell |
| TLR | Toll like receptors |
| TNF-α | Tumor necrosis factor alpha |
| TSI | Triple sugar iron |
| IU | International unit |
| VA | Vaculating |
| Vero | African green monkey kidney cells |
| Y-1 | Mouse adrenocortical cell |

# الفصل الاول

## ١ – المقدمة Introduction

تعد بكتريا *C. jejuni* من المسببات الرئيسة لالتهاب المعدة والامعاء (Gastroenteritis) المنقول عن طريق الغذاء والماء، اذ تحتل المرتبة الثالثة في الدول النامية كمسبب للإسهال عند الاطفال بعد بكتريا *E. coli* Enterotoxigenic والفايروس الدوار Rotavirus، بينما تعد اكثر شيوعاً من بكتريا *Salmonella* و*Shigella* كمسبب للإسهال في الدول المتطورة (AL-Delaimi and AL-Hadithi, 2008). وتشير تقارير منظمة الصحة العالمية ان امراض الاسهال والالتهابات المعوية تأتي بالمرتبة الثانية بين اسباب الوفيات ولاسيما عند الاطفال دون الخامسة من العمر خصوصا في الدول النامية (Forsberg *et al*., 2007)، اذ تسبب بكتريا *C. jejuni* وحدها ما يقارب 400 مليون حالة اسهال سنوياً (Walker, 2005).

ان اعراض الاصابة بالالتهاب المعوي الذي تسببه بكتريا *C. jejuni* تتراوح من بسيطة تشفى ذاتياً وتتمثل بحدوث اسهال مائي الى حادة وفيها يعاني المصاب من الم بطني حاد واسهال دموي وقيء، عندها يحتاج المصاب الى استخدام المضادات الحيوية وتعويض السوائل المفقودة نتيجة القيء والاسهال (Ketley, 1997; Al-Mahmeed *et al*., 2006). قد تنتشر بكتريا *C. jejuni* مباشرة من الامعاء لتسبب اصابات خارج الامعاء مثل تجرثم الدم (Bacteremia) والتهاب البنكرياس والتهاب الصفراء والتهاب البريتون والتهاب بطانة القلب وانتان الدم (Septicemia) وداء السحايا (Meningitis) فضلاً عن التهاب الكبد (Hepatitis). كما قد تسبب امراض ذاتية المناعة (Autoimmuno disease) مثل التهاب المفاصل (Reactive arthritis) ومتلازمة غليان بار (Guillain-Barre syndrome) (McCarthy and Giesecke, 2001; Blaser and Engberg, 2008).

تتميز بكتريا *Campylobacter* بشكلها الحلزوني او المنحني اذ تظهر تحت المجهر الضوئي الاعتيادي بشكل عصيات حلزونية او منحنية سالبة لصبغة غرام، او تظهر بشكل مشابه لجناح طائر النورس عندما تلتقي خليتان مع بعضهما، كما تتميز بانها اليفة للهواء القليل (Microaerophilic) واليفة لدرجات الحرارة العالية (Thermophilic) (vanVliet and Ketley, 2001; Winn *et al.*, 2006). ويتطلب عزل هذه البكتريا من العينات السريرية والبيئية توفر اوساط زرعية انتقائية (Franco, 1988).

تعيش بكتريا *Campylobacter* بشكل متعايش في امعاء العديد من الحيوانات ذات الحرارة المرتفعة (Warm blooded animals)، كالطيور التي تعد خازناً طبيعياً لبكتريا *C. jejuni* والتي تكون درجة حرارتها الطبيعية 42 م° وهي الدرجة المثلى لنمو هذه البكتريا، لذا تعد الطيور كالدواجن من المصادر الرئيسة لانتشار وانتقال هذه البكتريا من خلال تلوث لحوم ومنتجات الدواجن بها. كما تعد الابقار والاغنام والخنازير والقرود والقوارض والقطط والكلاب مصادر مهمة لتلوث البيئة من خلال براز الحيوانات الخازنة لهذه البكتريا او المصابة بها، اذ تلوث المياه والاغذية (Moor *et al.*, 2006; Young *et al*, 2007).

تمتلك بكتريا *C. jejuni* عدة اليات لإحداث الاصابة تشمل الاستعمار (Colonization)، والاجتياح او الغزو (Invasion)، والانتقال (Translocation)، وانتاج الذيفان (Toxin production) (Konkel *et al*., 2001; Newa and Jirog, 2009). تحتاج هذه البكتريا الى الحركة (Motility) كعامل ضراوة رئيس لاختراق الحاجز المخاطي المعوي واستعمار الطبقة المخاطية وللوصول الى مناطق الالتصاق على الخلايا الظهارية المعوية واختراق هذه الخلايا وبذلك تزيد من التركيز الموضعي للنواتج البكتيرية السامة (Nuijten *et al*., 1990). كما تعد الذيفانات من العوامل المهمة في الامراضية في حالات الاصابة ببكتريا *C. jejuni*، اذ تتميز هذه البكتريا بقابليتها على انتاج ذيفانات معوية (Enterotoxins) وذيفانات خلوية (Cytotoxins)

(Wassenar, 1997; Lee *et al*., 2000 ). ان بعض عزلات بكتريا *C. jejuni* التي تستعمر الكبد تنتج ذيفان خلوي يعرف بالذيفان الكبدي (Hepatotoxin) له اهمية في تحفيز التهاب الكبد (Kita *et al*.,1992; Fox *et al*., 2004). نظراً لأهمية بكتريا *C. jejuni* كمسبب للإسهال في الاطفال ولعدم وجود دراسة محلية عن الذيفان الكبدي المنتج من هذه البكتريا، لذا هدفت الدراسة الحالية الى بيان بعض التأثيرات الامراضية والمناعية للذيفان الكبدي لبكتريا *C. jejuni*. اذ تضمنت الدراسة المواضيع الآتية وكما مبين في الشكل (١-١):

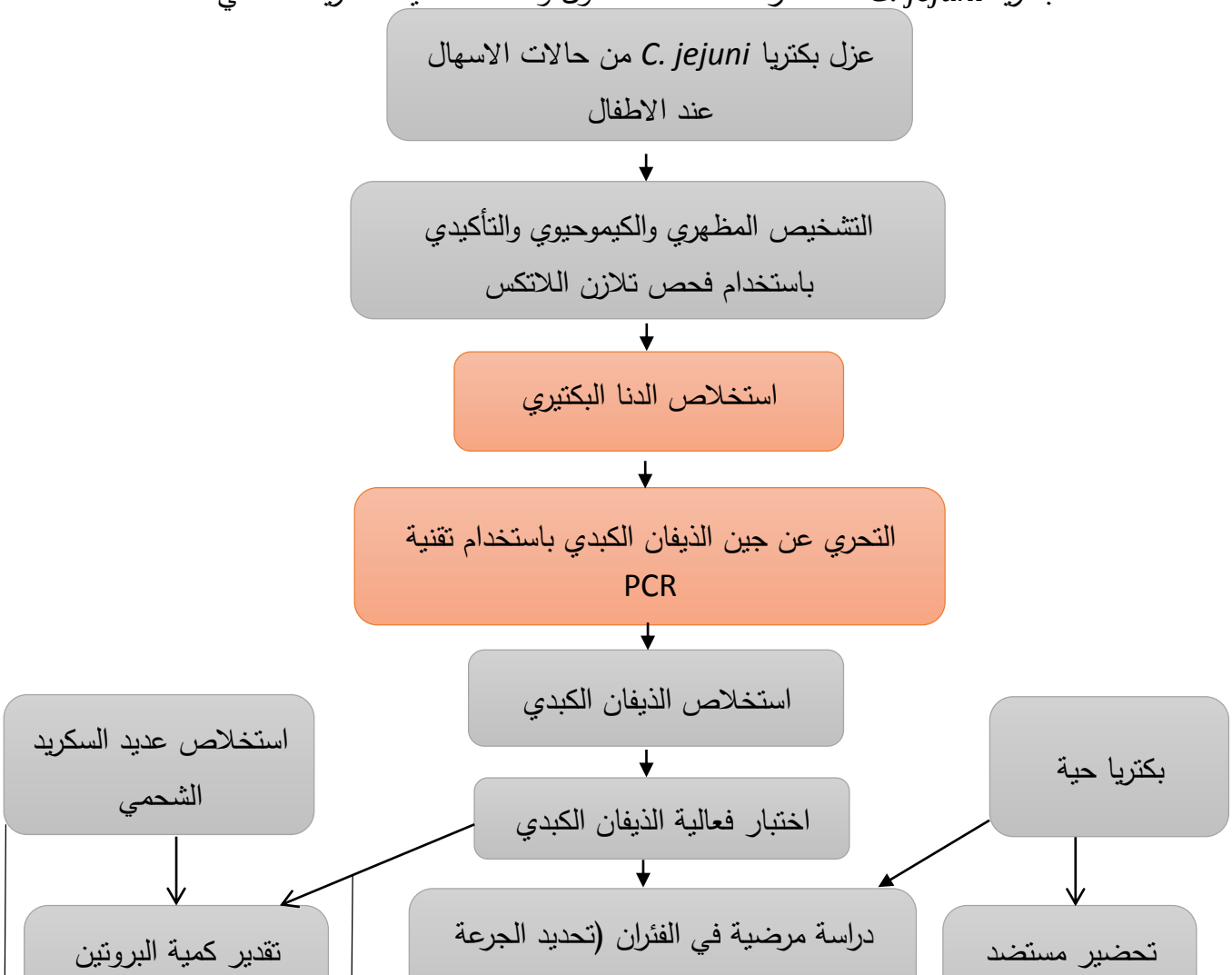
١- عزل وتشخيص بكتريا *C. jejuni* من حالات الاسهال عند الاطفال.

٢- التحري عن الجين المسؤول عن الذيفان الكبدي باستخدام تقنية PCR.

٣- استخلاص الذيفان الكبدي واختبار فعاليته في اناث الفئران السويسرية البيضاء(Swiss mice) نوع Balb/c mice (*Mus musculus*).

٤- دراسة مرضية لتأثير العالق البكتيري والذيفان الكبدي في اناث الفئران السويسرية والتي تشمل تحديد الجرعة المهلكة لنصف العدد والدراسة المرضية النسيجية.

٥- دراسة مناعية للذيفان الكبدي في الارانب المحلية (*Oryctologus cuniculus*) ومقارنته مع بعض مستضدات بكتريا *C. jejuni* المحضرة كالمستضد المقتول ومستضد عديد السكريد الشحمي.



# الفصل الثاني

# إستعراض المراجع

## ٢- استعراض المراجع Literature Review

### 2-1 نبذة تاريخية عن عزل بكتريا *Campylobacter*

وصفت هذه البكتريا لأول مرة عام 1886، إذ لاحظ الباحث Escherich وجود بكتريا حلزونية الشكل في المسحات المحضرة من عينات البراز وانسجة القولون لأطفال ماتوا بسبب الاسهال في المانيا، لكن لعدم قدرة الباحث على عزل هذه البكتريا على اوساط زرعية صلبة على الرغم من نموها في الاوساط السائلة، لم تعطَ هذه البكتريا أي اهمية سريرية (Kist, 1986). ثم عزلت هذه البكتريا عام 1913 في الولايات المتحدة من قبل McFaydean and Stockman من حالات الاجهاض الوبائي عند الاغنام، واشارا الى أنّ هذه البكتريا تعود لجنس الضمات *Vibrio* نظراً لشكلها الشبيه بالضمة (Butzler, 2004). وفي عام 1919 عزل Smith and Taylor البكتريا نفسها من انسجة اجنة الابقار المصابة بالإجهاض، فاقترحا اسم *Vibrio fetus* على النوع المسؤول عن حالات الاجهاض عند الحيوانات وسمي المرض بالإجهاض الضموي (Vibrionic

(abortion. وفي عام 1931 عزل الباحث Jones وجماعته نوعاً جديداً من هذه البكتريا من الجزء المعوي الصائم (Jejunum) من ابقار مصابة بالإسهال فاقترحوا تسمية هذا النوع بـ *Vibrio jejuni*.

لم تعرف بكتريا *Campylobacter* كمسبب للأمراض في الانسان حتى عام 1938 إذ ارتبطت مع تفشي حالات اسهال نتيجة تناول الحليب غير المبستر، واصابت 355 نزيلاً في مؤسستين متجاورتين في الينوي (Illinois) في الولايات المتحدة (Catteau, 1995). وفي عام 1947 تمكن Vinzent وجماعته من تنمية هذه البكتريا من دم نساء مصابات بالإجهاض. ثم استطاع King عام 1957 من عزل بكتريا *Campylobacter* من عينات الدم لأطفال مصابين بالإسهال، لكنه لم يستطع عزلها من عينات البراز وذلك للنمو المفرط للنبيت الطبيعي المعوي (Normal flora)، ونظراً لامتلاك هذه البكتريا صفات مستضدية وكيموحيوية مختلفة اطلق عليها تسمية المرتبطة بالضمات (Related *Vibrio*) (Altekruse *et al*., 1999). ولغرض اثبات ان هذه البكتريا هي المسببة لحالات الاسهال عند الانسان كان من الضروري ايجاد طريقة لعزل هذه البكتريا من عينات البراز، وقد استطاع Dekeyser وجماعته عام 1972 ولأول مرة من عزل هذه البكتريا من عينات البراز من مرضى مصابين بالإسهال باستخدام طريقة الترشيح (Filtration)، ومع تتابع البحوث والتجارب حول ايجاد اوساط زرعية صلبة انتقائية وتوفير ظروف استثنائية لمحاولة تنمية هذه البكتريا، استطاع Skirrow عام 1977 من عزل هذه البكتريا باستخدام وسط انتقائي إذ استطاع عزل نوعين من هذه البكتريا وهما *C. jejuni* و *C. coli* (Skirrow, 1977).

## 2-2 تصنيف بكتريا *Campylobacter*

كانت الانواع التابعة لجنس *Campylobacter* تصنف مع جنس الضمات، اذ وضعت مع عائلة الضمات Vibrionaceae بسبب تشابه الشكل، حتى عام 1963 اذ لاحظ Sebald and Veron ان هناك اختلافاً بين النوع *Vibrio fetus* وغيرها من الضمات مثل *Vibrio cholerae* و *Vibrio parahemolyticus* في تركيب الحامض النووي DNA ومتطلبات النمو لهذا اقترحا جنساً جديداً هو *Campylobacter* ضمن عائلة الحلزونيات Spirillaceae ليشمل النوع *Vibrio fetus* وبعض الانواع المشابهة. وفي عام 1973 وضع Veron and Chatelain اول نظام تصنيفي لبكتريا *Campylobacter* شمل فيه جنس الـ *Campylobacter* الانواع *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli* و *C. sputorum*. ونظراً لعدم وجود علاقة نشوء تطورية بين جنس *Campylobacter* والاجناس الاخرى في عائلة الحلزونيات، تم استبعاد جنس *Campylobacter* من عائلة الحلزونيات. وفي عام 1989 وضع Goodwin وجماعته اول خطوة لتنقيح تصنيف *Campylobacter*، إذ اشاروا الى وجود اختلافات وراثية ومظهرية بين انواع جنس *Campylobacter* والنوع *C. pylori*، فاقترحوا جنساً جديداً وهو *Helicobacter* ليشمل النوعين *C. pylori*

و *C. mustelae*. بعد ذلك جاء Vandamme and Ley عام 1991 ليكملا تنقيح تصنيف وتسمية الجنس *Campylobacter*، اذ وجدوا ان الاجناس *Campylobacter* و *Wolinella* و *Flexispira* ونوعين من انواع بكتريا *Bacteroides* تمثل مجموعة منفصلة ضم مجموعة البكتريا السالبة لصبغة غرام بالاعتماد على التحليل الجيني الرايبوسومي 16s rRNA تعرف هذه المجموعة او الفرع بـ(Epsilon sub-division of the Proteobacteria) ، ونظراً لوجود اختلافات مظهرية ووراثية متعددة اقترحا وضع الاجناس *Campylobacter* و *Arcobacter* ضمن عائلة مسستقلة هي Campylobacteraceae. فاصبح التصنيف العلمي لبكتريا *Campylobacter* (Garrity *et al*., 2005).

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Epsilonproteobacteria

Order: Campylobacterales

Family: Campylobacteraceae

Genus: *Campylobacter*

يضم جنس *Campylobacter* 16 نوعاً وستة تحت النوع (Subspecies)، تقسم هذه الانواع الى ثلاث مجاميع بحسب اهميتها الطبية (Gillespie and Hawkey, 2006):

المجموعة الاولى:– وهي أهم مجموعة متعلقة بصحة الإنسان، إذ تضم انواعاً من الممرضات المعوية المتحملة للحرارة (Thermophilic enteropathogenic *Campylobacter*) والتي تشمل *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* و *C. jejuni* .

المجموعة الثانية:– تضم أربعة أنواع معروفة بالنسبة للعاملين في مجال الطب البيطري بسبب تكرار حدوثها كممرضات ومتعايشات مع دواب الفلاحين كما انها قد تسبب امراضاً للإنسان وتتضمن *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis, C. laniena* و *C. fetus* .

المجموعة الثالثة:– تضم هذه المجموعة انواعاً موجودة كمتعايشات في التجويف الفموي للإنسان وتسبب امراض مختلفة للإنسان، وتشمل الانواع *C. gracilis*, *C. sputorum, C. concisus*, *C. curvas* , *C. showae* *C. hominus*, و *C. rectus* .

يعد النوعان *C. jejuni* و *C. coli* اكثر الانواع شيوعاً بين الانواع الممرضة للإنسان. ويعد النوع *C. jejuni* سبباً رئيساً لالتهاب الأمعاء في الإنسان (Skirrow and Blaser, 2000).

## 2–3 الصفات العامة لبكتريا *C. jejuni*

إن مصطلح (Campylo) هو مصطلح لاتيني مشتق من كلمة إغريقية (Kampylos) والتي تعني انحناء او تقوس، وتتصف خلايا بكتريا *Campylobacter* بكونها عصيات سالبة لصبغة غرام منحنية او حلزونية او بشكل حرف S أو تكون شكلاً يشبه أجنحة طائر النورس (Gull – winged) عندما تلتصق خليتان مع بعضهما او تكون سلسلة حلزونية طويلة، غير مكونة للأبواغ، صغيرة يبلغ عرضها حوالي ٠,٢ – ٠,٨ مايكرون وطولها حوالي ٠,٥ – ٥ مايكرون، تمتلك سوط قطبي واحد او سوطان في قطبي الخلية وتمتاز بحركتها السريعة بشكل يشبه انطلاق السهم (Darting motion) او بشكل يشبه حركة السدادات الفلينية (Cork screw-like) (Ketley, 1995; vanVliet and Ketley, 2001).

تمتلك بكتريا *Campylobacter* ظاهرة تعدد الأشكال (Polymorphism)، اذ تظهر خلاياها في المزارع القديمة بشكل كروي، انّ تحول الخلايا البكتيرية من الشكل الحلزوني الى الشكل الكروي يعتمد على مكونات الوسط الزرعي، اذ ان تعرض الخلايا الى مستويات عالية من الاوكسجين الجوي وجذور الاوكسجين الحرة او عند نفاذ المغذيات في الوسط الزرعي يؤدي الى تحول الخلايا الى الشكل الكروي. وأن سبب التحول يعود الى تغيرات في تركيب طبقة الببتدوكلايكان بفعل الانزيمات الحالة، مما يؤدي الى تحلل الغشاء الخلوي (Moran and Upton, 1987). ان الشكل الكروي هو شكل حي غير قابل للتنمية على الوسط الزرعي (Viable but nonculturable coccoid form) ويمثل حالة ساكنة تتكيف له الخلية عند تعرضها لظروف غير ملائمة لنموها (Rollins and Colwell, 1986). ان هذا الشكل قد يكون ممرض للفئران الرضيعة، لكن هذه الصفة تختلف بين سلالات بكتريا *C. jejuni* (Jones *et al.*, 1991).

تمتاز بكتريا *C. jejuni* بانها أليفة للهواء القليل، إذ تحتاج إلى ٥% أوكسجين و١٠% من ثاني أوكسيد الكربون و٨٥% نيتروجين، كما تتميز بأنها أليفة لدرجات الحرارة العالية على أن لا تزيد عن ٤٤ م°، وتعد درجة ٤٢ م° الدرجة الحرارية المثلى لنمو بكتريا *C. jejuni* وهذا يفسر تكيفها للعيش في امعاء الحيوانات ذات الحرارة المرتفعة. كما تنمو هذه البكتريا ضمن مدى الرقم الهيدروجيني 5.5–8.5، الا ان الرقم الهيدروجيني الامثل لنموها يتراوح ما بين 6.5–7.5 (Winn *et al.*, 2006).

تتكون المادة الوراثية لبكتريا *C. jejuni* من كروموسوم حلقي صغير يبلغ حجمه حوالي ١,٦٤١,٤٨١ زوج قاعدي، ويشكل نسبة ٣٦% من حجم كروموسوم بكتريا *E. coli*، وتبلغ نسبة الكوانين والسايتوسين G+C فيه ٣٠,٦% ويشفر الى ١,٦٥٤ بروتين و٥٤ نوع ثابت من RNA (Chang and Taylor 1990; Kim *et al.*, 1992). كما تحتوي هذه البكتريا على عناصر خارج كروموسومية مثل البلازميدات التي تحتوي على جينات اساسية تحتاجها البكتريا داخل المضيف. ان الحجم الصغير لجينوم بكتريا *C. jejuni* متناسق مع

طبيعة البكتريا الصغيرة والصعبة، إذ تحتاج هذه البكتريا الى مدعمات عديدة لنموها، ولا تستطيع تحطيم المواد المعقدة، وهي خاملة حيوياً (Griffiths and Park, 1990; Taylor, 1992).

ان بكتريا *C. jejuni* كيموعضوية التغذية (Chemoorganotrophic)، لا تستخدم الكاربوهيدرات كمصدر للطاقة والكاربون لعدم امتلاكها الانزيم المحلل للسكر (Phosphofructokinase)، وتحصل عادة على الطاقة من ايض الأحماض الأمينية أو ايض المنتجات الوسطية لدورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل (Hofreuter *et al*., 2008). غير محللة للجيلاتين، سالبة لفحص احمر المثيل والفوكس بروسكور، غير منتجة للأنزيم المحلل للدهون (Lipase) وانزيم اليوريز (Urease)، وتختزل النترات الى نتريت، محللة للهيبيورات، منتجة لأنزيم الأوكسيديز (Oxoidase)، وانزيم الكاتليز (Catalase) (Gillespie and Hawkey, 2006).

## 2-4 التشخيص المختبري لبكتريا *C. jejuni*

ان الطرائق التقليدية المستخدمة في المختبرات لا يمكن استخدامها لزرع وتنمية بكتريا *Campylobacter*؛ بسبب احتياج هذه البكتريا الى اوساط انتقائية خاصة وظروف غازية خاصة فضلاً عن درجات حرارية تختلف عن تلك المستخدمة لحضن غيرها من البكتريا. وقد اشارت الدراسات الى امكانية التشخيص الافتراضي السريع لبكتريا *Campylobacter* في عينات البراز، من خلال الفحص المجهري المباشر (Microscopic detection) لمسحات عينات البراز بعد تصبيغها بصبغة بسيطة مثل الكاربول فوكسين بتركيز ١%، إذ تتحرى هذه الطريقة عن الخلايا البكتيرية الحية والميتة (Park *et al.*, 1983). بينما يمكن التحري عن الخلايا البكتيرية الحية فقط في عينة البراز وذلك بعمل مسحة رطبة على شريحة زجاجية لملاحظة الحركة السريعة للبكتريا كانطلاق السهم (Taylor *et al*., 1988; Cheesbrough, 1991).

يتطلب عزل بكتريا *Campylobacter* من العينات البيئية والسريرية المختلفة توفر ظروف انتقائية خاصة للحصول عليها بشكل نقي من جهة ولتسهيل زيادة إعدادها من جهة أخرى إذ إنها غالبا ما توجد بإعداد قليلة في العينات السريرية مع وجود إعداد كبيرة من الكائنات المنافسة لهذه البكتريا في مواقع تواجدها (Goossens and Butzler, 1992; Jeffrey *et al*., 2000). وقد اشارت الدراسات الى امكانية عزل بكتريا *Campylobacter* من خلال طريقتين: احداهما طريقة الترشيح (Filtration)، ويعد Dekeyser اول من وصف هذه الطريقة عام 1972، وذلك بامرار العينة عبر ورق ترشيح او مرشحات سليلوزية قطر ثقوبها 0.45 او 0.65 او 0.8 مايكرون. بعدها يلقح الوسط الزرعي بالراشح وتحضن الاطباق في ظروف غازية

اليفة الهواء القليل وبدرجة 42 م°. ان اساس هذه الطريقة هي ان خلايا بكتريا *Campylobacter* صغيرة جداً ونشطة الحركة وهذا يمكنها من المرور عبر المرشحات المستخدمة (Dekeyser *et al*., 1972).

اما الطريقة الاخرى لعزل بكتريا *Campylobacter* هي استخدام اوساط انتقائية خاصة مزودة بالمضادات الحيوية اللازمة لتثبيط النبيت الطبيعي المعوي والذي من الممكن ان ينمو على هذه الاوساط ويطغى نموه على نمو بكتريا *Campylobacter* التي تتميز ببطيء نموها وتضاعفها وبذلك لا يمكن عزلها (Franco, 1988). ويعد Skirrow اول من وصف هذه الطريقة من خلال استخدام وسط انتقائي يتكون من اغار الدم الاساس (Blood base agar) ودم حصان متحلل بتركيز 7%، ومزيج من المضادات الحيوية (Trimethoprim), (Polymyxin B) و(Vancomycin) (Skirrow, 1977). بعدها اقترح الباحثون استخدام اوساط انتقائية مختلفة تختلف في نوع الوسط الاساس وكذلك في انواع المضادات الحيوية وتراكيزها فضلاً عن اختلافها في وجود او غياب مدعمات النمو كالدم (Ng *et al*., 1985). اذ يضاف المضاد الحيوي (Trimethoprim) مع (Polymyxin B) او يضاف (Cefoperazone) و(Colistin) الى بعض الاوساط لتثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة غرام. كما استخدم المضاد الحيوي (Cycloheximide) او (Amphotericin B) لمنع نمو وتكاثر الخمائر والاعفان، اما المضاد الحيوي (Rifampin) او (Vancomycin) فيستخدم لتثبيط البكتريا الموجبة لصبغة غرام(Dasti, 2007).

ان بكتريا *Campylobacter* صعبة التنمية وشديدة الحساسية (Fastidious bacteria)، اذ تحتاج لنموها اوساطاً زرعية مدعومة بالدم ومنشطات النمو التي تشمل بايروفات الصوديوم (Sodium pyruvate) وكبريتات الصوديوم (Sodium metabiosulfate) وكبريتات الحديد (Ferrus sulfate) (Corry *et al*., 1995; Blais and Phillippe, 1999). تساعد هذه المنشطات على تحفيز النمو في البكتريا وتحسن من تحملها للظروف الهوائية من خلال كبح الفعل السمي للجذور عالية الطاقة مثل (Superoxide, peroxides) والتي تتولد نتيجة الاختزال الكيموضوئي لمكونات الوسط الزرعي (Goossens and Butzler, 1992). اشار Smibert (1978) الى ان (Pyruvate) يحطم بيروكسيد الهيدروجين بينما يتأزر الحديد مع (Bisulfite) على تحطيم جذور (Superoxide). كما يعمل (Pyruvate) و (Glutathione) على حماية الخلية البكتيرية من التحطم الذاتي من خلال التقليل من ضغط الاوكسجين في الوسط الزرعي، كما يحفز التعبير عن جينات مرتبطة بالطور الثابت والتي تسمح للخلية بالتكيف استجابة للضغط ويحميها من المسخ (Dodd, 1997). ان اضافة الدم يساعد ايضا على ازالة مشتقات الاوكسجين السامة بكفاءة عالية، نظراً لاحتوائه على انزيمات عديدة مثل (Catalase) و (Peroxidase) و(Peroxide dismutase) والتي لها القابلية على الحد من سمية مشتقات الاوكسجين (Goossens and Butzler, 1992).

للتأكد من التشخيص تجرى الفحوصات الكيموحيوية للتمييز بين الانواع التابعة لجنس *Campylobacter* ومن اهمها فحص تحلل الهيبيورات، إذ ان بكتريا *C. jejuni* موجبة لهذا الفحص مع ذلك توجد بعض الصعوبات التي يمكن ملاحظتها عند بعض السلالات العائدة لبكتريا *C. jejuni* والتي تكون غير قادرة على تحلل الهيبيورات (Totten *et al*., 1989).

ان التمييز بين أنواع وضروب جنس *Campylobacter* يمكن أن يتم بوساطة الاختبارات المظهرية والوراثية (Wassenaar and Newell, 2000). ومن الاختبارات المظهرية المستخدمة هي الاختبارات الكيموحيوية والاختبارات المصلية. إذ يستخدم التنميط المصلي (Serotyping) عادة في الدراسات الوبائية (Jackson *et al.*, 1998) ، ومنها طريقة (Penner method) التي تتضمن التحري عن المستضدات الثابتة بالحرارة باستخدام تفاعل التلازن الدموي (Penner, 1988). وطريقة (Lior method) التي تتضمن التحري عن المستضدات المتغيرة بالحرارة مثل الاسواط باستخدام طريقة التلازن على الشريحة (Lior *et al.*, 1984). كما تستخدم الطرق المصلية كاختبارات تأكيدية على تشخيص بكتريا *Campylobacter* في العينات السريرية والبيئية. ومنها اختبار تلازن اللاتكس (Latex agglutination test) ويستعمل في هذا الفحص حبيبات اللاتكس المغطاة بالاضداد متعددة النسل (Polyclonal antibodies) للتحري عن مستضد البروتين الغشائي الخارجي او المحددات المستضدية للأسواط لبكتريا *Campylobacter* (Miller *et al.,* 2008).

أما الطرائق الوراثية فهي متطورة وقادرة على تحديد نوع السلالات التي لا يمكن تحديدها بالطرائق المظهرية (Newell *et al*., 2000). ومن الطرائق الوراثية المستخدمة تقنية الترحيل الكهربائي النبضي (Pulsed field gel electrophoresis) وتقنية التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا PCR. وهناك تقنيات أخرى للتمييز بين الانواع تتضمن استخدام العاثي، وتحليل بروتينات الغشاء الخارجي، والترحيل الكهربائي للإنزيمات متعدد المواقع (Dingle *et al*., 2002).

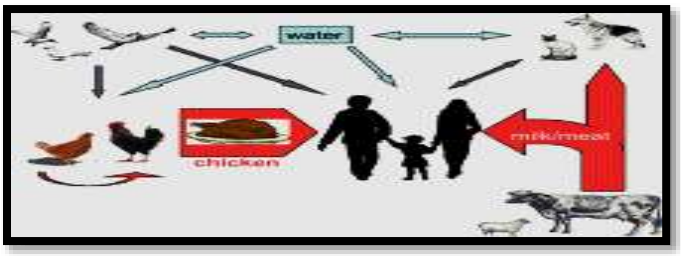
## ٢-٥ انتقال وانتشار بكتريا *C. jejuni*

يعد داء العطائف (Campylobacteriosis) من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان (Zoonotic) (AL-Bashan and AL-Banki, 2010). اذ تعيش بكتريا *C. jejuni* بشكل متعايش (Commensal) في امعاء العديد من الحيوانات ذات الحرارة المرتفعة ومنها الطيور سواء الداجنة او البرية والتي تعد الخازن الرئيس لهذه البكتريا، والتي تكون درجة حرارتها الطبيعية 42 م° وهي الدرجة المثلى لنمو بكتريا *C. jejuni*. لذا تعد الطيور وخاصة الدواجن من المصادر الرئيسة لانتشار وانتقال هذه البكتريا الى الانسان من خلال تلوث لحوم ومنتجات الدواجن (Young *et al.,* 2007; Li *et al*., 2008). كما تعيش بكتريا *C. jejuni* بشكل متعايش في أمعاء الاغنام والابقار والخنازير والقوارض، وتسبب الاسهال في الماشية

والاجهاض في الاغنام. وبذلك تعد هذه الحيوانات من المصادر المهمة لانتقال هذه البكتريا اذ انها تلوث المياه والاغذية (Kwan *et al*., 2008). كما تشير الدراسات الى امكانية انتقال هذه البكتريا الى الانسان من خلال القطط والكلاب الخازنة او المصابة بها والتي تربى منزلياً، إذ تستمر هذه الحيوانات في طرح بكتريا *C. jejuni* مع البراز لأكثر من سنة (Damborg *et al*., 2004).

تعد الاغذية من اكثر الطرق شيوعاً لانتشار وانتقال بكتريا *C. jejuni* ، كالحليب غير المبستر، إذ وجد ان هذه البكتريا يمكن ان تكيف نفسها في الحليب وان تبقى حية لمدة تتراوح بين 2–5 اسابيع بدرجة 4 م° (Walker *et al*., 1986). كذلك اللحوم الحمراء والدواجن غير المطبوخة جيداً واللحوم المحفوظة بالتبريد من الممكن ان تكون ملوثة، فقد وجد ان بكتريا *C. jejuni* لها القابلية ان تبقى حية عدة اسابيع بدرجة حرارة 4 م° على السطح الرطب للدواجن، كما وجد ان هذه البكتريا يمكن ان تتواجد على قشور البيض. ايضاً تم عزل هذه البكتريا من ذبائح الدجاج واللحم المجمد والطازج وبواقع 6 عينات حاملة لهذه البكتريا من اصل 10عينات (Svedham *et al*., 1981). واشارت بعض الدراسات الى ان بعض الحشرات خصوصاً الذباب لها دور رئيس في نقل بكتريا *C. jejuni* الى غذاء الانسان(Ekdahl *et al*., 2005).

تعد المياه الملوثة غير المعقمة أحد المصادر المهمة لانتشار بكتريا *C. jejuni* وانتقالها الى الانسان، واشارت الدراسات الى تلوث المياه ببراز الحيوانات الخازنة لهذه البكتريا او المصابة بها، وان هذه البكتريا يمكنها ان تقاوم الظروف غير الملائمة لنموها في المياه بالعيش لأوقات طويلة داخل بعض الاوالي (Protozoans) مثل *Acanthamoeba castellanii* و*Acanthamoeba polyphages* (Snelling *et al*., 2008).




**الشكل (2–1) مصادر انتقال بكتريا *C. jejuni* الى الانسان (Young *et al*., 2007) .**

## ٢–٦ الوبائية Epidemiology

تعد بكتريا *C. jejuni* من المسببات الرئيسة لالتهاب المعدة والأمعاء الذي يصيب الإنسان في معظم بلدان العالم إذ انها مسؤولة عن ٩٥–٩٩% من اصابات بكتريا *Campylobacter* (Mandell *et al*., 2000; AL-Delaimi and AL-Hadithi, 2008). وتشير الدراسات الوبائية انها تسبب ما يقارب 400

مليون حالة اسهال سنوياً (Walker, 2005). إن معدل حدوث الاصابة بهذه البكتريا غير متماثل عالمياً، إذ يختلف في الدول المتقدمة عن الدول النامية (Coker *et al*., 2002). ففي الدول المتقدمة تحدث الاصابة ببكتريا *C. jejuni* بصورة متقطعة (Sporadic)، وتعد الاصابة بهذه البكتريا اكثر شيوعاً من الاصابة ببكتريا *Salmonella* و *Shigella* (Altekruse *et al*., 1999) كما تحدث الاصابة في البالغين والاطفال بعمر ٦-١٥ سنة (Ketley, 1997; Blaser, 1997).

اما في الدول النامية تكون الاصابة ببكتريا *C. jejuni* اكثر شيوعاً ومتوطنة بدرجة عالية (Hyperendemic) نتيجة الظروف الصحية السيئة وقلة الوعي الصحي والاحتكاك المباشر والمستمر مع الحيوانات الخازنة لهذه البكتريا (Katarzyna, 2009). وتنتشر الاصابة بهذه البكتريا في الدول النامية في الاطفال دون الخامسة من العمر إذ تحدث بمعدل ٤٠-٦٠ الفاً لكل ١٠٠ الف طفل، وتحتل المرتبة الثالثة كمسبب للإسهال في الاطفال بعد بكتريا Enterotoxigenic *E. coli* والفايروس الدوار Rotavirus (AL-Delaimi and AL-Hadithi, 2008). اما البالغون فهم اقل عرضة للإصابة في البلدان النامية بسب تعرضهم لهذه البكتريا اثناء الطفولة (Chang and Miller, 2006). وبصورة عامة ان نسبة الاصابة بهذه البكتريا اكثر ارتفاعاً في الاشهر الحارة من السنة، كما تصيب الذكور اكثر من الاناث، وأنّ الاشخاص ضعيفي المناعة (Immunocompromised) اكثر عرضة للإصابة بمقدار 40-100 مرة (Unicomb *et al*., 2008).

تحتل بكتريا *C. jejuni* المرتبة الثانية كمسبب لإسهال المسافرين (Traveller diarrhea) بعد بكتريا Enterotoxigenic *E. coli* ، وان الخطورة التي تشكلها هذه البكتريا كمسبب لإسهال المسافرين تكمن في طرح المصابين في البراز نسبة عالية من السلالات المقاومة للمضادات الحيوية مثل المقاومة لمضادات (Macrolides) و (Fluoroquinolones) (Scott, 1997; Gallardo *et al*., 1998).

## 2-7 الاعراض السريرية

ان اعراض الاصابة ببكتريا *C. jejuni* لا تختلف سريرياً عن اعراض الاصابة ببكتريا *Salmonella* او *Shigella* لذا من الضروري التحري عن وجود بكتريا *C. jejuni* في عينات البراز (Blaser and Engberg, 2008). قد تظهر اعراض الاصابة بالالتهاب المعوي الذي تسببه بكتريا *C. jejuni* بعد مدة حضانة 2-5 ايام من ابتلاع غذاء او ماء ملوث بالبكتريا وتتميز بانها بسيطة تشفى ذاتياً، إذ يصاب الشخص بإسهال مائي (Watery diarrhea) مع ألم بطني وحمى وقشعريرة والم عضلي وصداع (Blaser, 1997) . او تظهر الاعراض بعد مدة حضانة 2-11 يوماً وتستمر عدة اسابيع، وتكون حادة إذ يصاب الشخص بألم بطني حاد والذي يؤدي الى الشك بالتهاب الزائدة الدودية مع تقيئ واسهال دموي (Bloody diarrhea) يتميز

بوجود الخلايا البيض والخلايا الحمر، وفي هذه الحالة يحتاج المريض الى استخدام المضادات الحيوية والتعويض عن السوائل المفقودة (Al-Mahmeed *et al*., 2006; Galanis, 2007).

قد يشفى المريض ذاتياً ويختفي الاسهال خلال 3–5 ايام لكن الشخص المعافى يستمر في طرح البكتريا مع البراز لأكثر من 30 يوماً (Kapperud *et al.*, 1992)، او قد يتعرض 20%من المصابين الى نكسة (Relapse) او يعانون من مرض حاد يستمر لمدة طويلة، ونادراً ما تكون الاصابة مميتة الا في كبار السن والاشخاص ضعيفي المناعة (Blaser and Engberg, 2008).

ان الاعراض السريرية الناتجة عن الاصابة ببكتريا *C. jejuni* تعتمد على ضراوة السلالة المسببة للإصابة وجرعة الاصابة وحساسية المريض للإصابة. وان الاشخاص المعرضين لإصابات سابقة بسبب استهلاكهم الحليب الخام غير المبستر قد لا تظهر عليهم أية اعراض مقارنة بالأشخاص الذين لم يتعرضوا لإصابات سابقة، إذ يعمل هؤلاء الاشخاص كحامل للإصابة (Blaser *et al*., 1987).

## 2–8 مضاعفات خارج الامعاء Extra-intestinal complications

تنتشر بكتريا *C. jejuni* مباشرة من الامعاء لتسبب اخماج مختلفة خصوصاً في الاشخاص ضعيفي المناعة مثل المصابين بالإيدز (AIDS) او المصابين بفقر كلوبيولين كاما (Hypogammaglobulinemia) او مرضى السرطان (Rathinam *et al*., 2009). تخترق هذه البكتريا جدار الامعاء وتغزو المجرى الدموي للمريض وتسبب تجرثم الدم (Bacteraemia) ، فقد عزل Ladron de Guevara وجماعته (1994) بكتريا *C. jejuni* من الدم من 7 حالات مصابة بالإيدز. كما حصلت حالة تجرثم الدم بهذه البكتريا بعد زرع نقي العظم (Bone marrow transplant) (Hagensee *et al.* 1994). وسجلت دراسات مختلفة انتشار بكتريا *C. jejuni* من الامعاء لتسبب التهاب الصفراء (Cholecystitis) ، والتهاب تجويف الخلب (Peritonitis)، والتهاب البنكرياس (Pancreatitis)، والتهاب شغاف القلب (Endocarditis)، والتهاب عضلة القلب (Myocarditis)، والتهاب الكلية (Nephritis)، والتهاب الجراب (Bursitis) وافات جلدية (Skin lesion) (Autenrieth, 1996; Blaser, 1997; Allos, 2001). كما تسبب اخماج جهازية (Systemic infections) وانتان الدم (Septicemia) في الاشخاص ضعيفي المناعة، وتصل نسبة الوفيات في هؤلاء الاشخاص بسبب انتان الدم الى 30% (Katarzyna *et al*., 2009).

تسبب بكتريا *C. jejuni* التهاب الكبد (Hepatitis)، فقد وصف Ampelas وجماعته (1982) حالة التهاب الكبد مع وجود نخر وارتشاح للخلايا الالتهابية في خزعة مأخوذة من كبد مريض مصاب بالتهاب معوي بسبب بكتريا *C. jejuni* (Kita *et al*., 1986). كما لاحظ Reddy and Thomas (1982) وجود اختلال حاد في اختبارات وظيفة الكبد (Liver function tests) لمريض مصاب بالتهاب معوي بسبب بكتريا *C.*

*jejuni*. وسجل Pitkanen وجماعته (1983) ارتفاع كبير في فعالية الانزيمات الناقلة لمجموعة الامين (Transaminases) في عدد كبير من الاطفال المصابين بالتهاب معوي سببه بكتريا *C. jejuni* في بلغاريا. كما وصف Comas وجماعته (2009) حالة التهاب الكبد في طفل عمره ثلاثة اشهر بعد اصابته بالتهاب معوي بسبب بكتريا *C. jejuni*.

ان اصابة المرأة الحامل ببكتريا *C. jejuni* يؤدي الى تجرثم الدم وينتج عنه اصابة الجنين داخل الرحم مما يؤدي الى الاجهاض او الولادة المبكرة للجنين (Premature labor) أو موت الجنين (Still birth) او موت الام (Smith, 2002). كما ان اصابة الطفل اثناء الولادة او بعدها بهذه البكتريا يسبب التهاب معوي عند حديثي الولادة (Neonatal enteritis) والتهاب السحايا الولادي (Neonatal meningitis) وانتان الدم الولادي (Perinatal sepsis) (Simor *et al*., 1986).

تؤدي الاصابة ببكتريا *C. jejuni* احياناً الى تطور امراض ذاتية المناعة (Autoimmuno disease) مثل التهاب المفاصل النشط (Reactive arthritis) ومتلازمة رايتر (Reiter syndrome) ومتلازمة غليان بار (Guillain-Barre syndrome) ومتلازمة ميلر فشر (Miller-Fisher syndrome) (Pope *et al*., 2007). تؤثر متلازمة غليان بار ومتلازمة ميلر فشر على الجهاز العصبي المحيطي وتسبب التهاب عصبي متعدد موهن يتميز بألم وضعف عضلي قد يتقدم إلى الشلل (Tam *et al*., 2003) . اشارت الدراسات ان 30–40% من حالات متلازمة غليان بار تحدث بعد الاصابة ببكتريا *C. jejuni*، كما تكون اكثر حدة من مثيلاتها التي تحدث بعد الاخماج الفايروسية او البكتيرية الاخرى، إذ تسبب شلل طويل المدى وضرر عصبي غير رجعي وحتى الموت (McCarthy and Giesecke, 2001). وتعزى هذه المتلازمات الى التشابه الجزيئي(Molecular Mimicry) بين اجزاء عقدية (Gangliosides) في الخلايا العصبية للإنسان مع محددات كاربوهيدراتية موجودة في طبقة اللب الخارجية لعديد السكريد الشحمي لبكتريا *C. jejuni* (Godschalk *et al*., 2007).

تعد الاصابة ببكتريا *C. jejuni* احد عوامل الخطورة لتطور مرض المعي الالتهابي (Inflammatory bowel disease) بنسبة 20–30% (Kalischuk *et al*., 2009)، إذ تحطم بكتريا *C. jejuni* الحاجز الظهاري المعوي مما يسمح بانتقال النبيت الطبيعي المعوي الى الاجزاء تحت الظهارية (Kalischuk and Buret, 2010). كما اشارت احد الدراسات الى ارتباط هذه البكتريا مع تطور الورم اللمفي في الانسجة اللمفاوية المرتبطة بالجهاز المخاطي المعوي (Intestinal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) (Lecuit *et al*., 2004).

## 2–9 عوامل الضراوة Virulence factors

**1-الاسواط** **Flagella** تمتلك بكتريا *C. jejuni* سوط قطبي واحد او اثنان وان وجود السوط القطبي يمنح هذه البكتريا الحركة السريعة المشابهة لانطلاق السهم وهذا يساعدها في التغلب على الطبقة المخاطية اللزجة في بطانة المعدة والامعاء وعلى التمعج المعوي (Intestinal peristalsis) ومن ثم يسهل الالتصاق والاستعمار وغزو الخلايا الظهارية المعوية (Wassenaar *et al*., 1991; Nachamkin *et al*., 1993). اضافة الى ذلك يلعب السوط دوراً مهماً في افراز مجموعة من بروتينات الضراوة تسمى *Campylobacter* invasion antigen (Cia) ، وفي الانجذاب الكيميائي (Chemotaxis) والتلازن الذاتي (Autoagglutination) وفي التهرب من دفاعات المضيف (Guerry, 2007).

ان فقدان سوط بكتريا *C. jejuni* للجزيئات التي تميزها مستقبلات Toll-like receptor 5 (TLR 5) الموجودة على خلايا المضيف يؤدي الى التهرب من الدفاعات المناعية للمضيف (Andersen-Nissen *et al*., 2005). وقد تم اثبات اهمية السوط كعامل ضراوة عن طريق استخدام سلالة طافرة غير متحركة، إذ اظهرت عدم قدرتها على استعمار امعاء الفئران (Taylor, 1992).

**٢- المحفظة** **Capsule**

تعدّ المحفظة الغلاف الخارجي الذي يحيط بالخلية البكتيرية وهي عبارة عن مركب من عديد السكريد (Polysaccharides) وعلى أساس تركيبه صنفت بكتريا *C. jejuni* إلى أنواع مصلية مختلفة (Poly and Guerry, 2008). تمتلك بكتريا *C. jejuni* محفظة متغايرة بدرجة عالية، مما يؤدي الى التغاير المظهري (Phase variation) الذي يمكن البكتريا من التهرب من دفاعات المضيف (Karlyshev *et al*., 2005; Young *et al*., 2007). تعمل المحفظة على حماية بكتريا *C. jejuni* من دفاعات المضيف غير المتخصصة وخاصة فعل المتمم (Keo *et al*., 2011).

**3- بروتينات الغشاء الخارجي** **Outer membrane proteins**

تمتلك بكتريا *C. jejuni* عدد من البروتينات منها سطحية والاخرى موجودة في (Periplasm)، تسهل هذه البروتينات التصاق بكتريا *C. jejuni* الى الخلايا الظهارية في الامعاء (Poly and Guerry, 2008).

اشار De Melo and Pechère (1990) الى امتلاك بكتريا *C. jejuni* مجموعة من بروتينات الغشاء الخارجي اوزانها الجزيئية 28، 32، 37 و 42 كيلو دالتون لها دور في ارتباط بكتريا *C. jejuni* الى الخلايا الظهارية. منها CadF وهو عبارة عن بروتين سطحي وزنه الجزيئي 37 كيلودالتون مشابه لبروتين الغشاء الخارجي A في بكتريا *E. coli*، يرتبط هذا البروتين مع (Fibronectin) الموجود على السطح القاعدي للخلايا الظهارية (Monteville and Konkel, 2002; Monteville *et al*., 2003) .

من البروتينات الاخرى هو JlpA وهو عبارة عن بروتين شحمي (Lipoprotein) سطحي وزنه الجزيئي 42 كيلو دالتون يرتبط مع بروتين الصدمة الحرارية (Heat shock protein 90) الموجود على سطح الخلايا الظهارية، ان هذا الارتباط يؤدي الى تحفيز مسار اشارات داخل الخلايا الظهارية مما يؤدي الى تنشيط Mitogen-activated protein kinase (MAPK) و Nuclear factor-kappa B (NF-κB) ومن ثم تحفيز الاستجابة السابقة للالتهاب (Proinflammatory responses) (Jin *et al.*, 2003).

ومن البروتينات الشحمية الاخرى التي تلعب دوراً في التصاق هذه البكتريا هو CapA ، إذ وجد Ashgar وجماعته (2007) في تجربة اجراها في الزجاج ان استخدام عزلة طافرة حذف فيها الجين المسؤول عن انتاج CapA اضعف من قدرتها على الالتصاق الى خط الخلايا الظهارية Caco-2.

PEB1 من البروتينات الموجودة في (Periplasm) وزنه الجزيئي 28 كيلودالتون، وهو شبيه بنواقل الاحماض الامينية المرتبط بالادينوسين ثلاثي الفوسفيت (Amino acid ATP-binding cassette) في البكتريا السالبة لصبغة غرام (Pei and Blaser, 1993)، يتم تعريضه للسطح عند استلام اشارات معينة إذ يرتبط مع الحامضين الامينين الكلوتاميت والاسبارتيت، ان ارتباط PEB1 مع الخلايا الظهارية يسهل الاستعمار، وان استخدام عزلة طافرة فاقدة للجين الذي يشفر الى PEB1 يؤدي الى ضعف الاستعمار وربما يعود الى ضعف نقل الاحماض الامينية (Pei *et al.*, 1998). من البروتينات الاخرى الموجودة في (Periplasm) والتي لها دور في التصاق بكتريا *C. jejuni* الى الخلايا الظهارية وغزو هذه الخلايا هو بروتين سكري (Glycoprotein) يعرف بـ Cj 1496 (Kakuda and Dirita, 2006).

**4- عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide**

ان عديد السكريد الشحمي مكون اساسي للغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام ويعد من الصفات التفريقية عن البكتريا الموجبة لصبغة غرام ويطلق عليه مصطلح الذيفان الداخلي (Endotoxin). وهي جزيئة ثابتة حراريا ذات وزن جزيئي عال تعزل وتتحرر عند تحلل وموت الخلية (Hitchcock *et al.*, 1986). اثبتت الدراسات ان عديد السكريد الشحمي لبكتريا *C. jejuni* يحتوي على المكونات الرئيسة الثلاثة: منطقة الشحم (Lipid A) ومنطقة اللب (Core) والسلسلة الجانبية (O- specific–) والتي تسمى المستضد الجسمي (O-antigen)، وتتميز منطقة الشحم في بكتريا *C. jejuni* باحتوائها على جزيئتين من مركب 2,3- diamino 2,3 - dideoxy D – glucose (GLCN3N) مرتبط بمركب D-glucoseamine (GLCN) ، بينما تحتوي العائلة المعوية على جزيئتين من مركب (GLCN) مرتبط بالآصرة (β1-6) وعدم وجود المركب (GLCN3N) (Moran, 1997). كما ان منطقة الشحم في بعض سلالات بكتريا *C. jejuni* يحوي على

احماض شحمية قصيرة غير موجودة في أفراد العائلة المعوية مثل (Cyclopropane acid) و (Octadecanoic acid) (Moran *et al*., 1991).

اما منطقة اللب فتتميز بأن منطقة اللب الخارجي (Outer core) تحتوي على مركب خاص هو N-acetyl neuraminic acid (Neu5Ac) او ما يسمى حامض الساليك (Sialic acid)، ان ارتباط هذا المركب مع جزيئة الكالاكتوز برابطة (β2-3) يكون تركيب يشابه تركيب عقد (Gangliosides) في الخلايا العصبية للإنسان، مما يلعب دوراً مهماً في تطور الامراض العصبية ذاتية المناعة (Moran, 1997; Penner and Aspinall, 1997). اما منطقة السلسلة الجانبيه فتحتوي على وحدات متكررة من مركب (ß,D-glucuronic acid) وهذا المركب يرتبط باصرة امايد مع مركبي (2-amino-2-deoxyglycerol) و (N-acetylglucosamine) فضلا عن سكريات مثل سكر الكلاكتوز والهبتوز، عن طريق هذا التركيب وجد هنالك شبه بين تركيب السلسله الجانبية -O - وتركيب حامض (Hyaluronic acid) الموجود في انسجة البشر (PennerandAspinall,1997).

وجد ان بعض الانماط العائدة الى بكتريا *C. jejuni* تصنع نوعين من عديد السكريد الشحمي الاول واطئ الوزن الجزيئي او فاقد للسلسلة الجانبية يعرف بـ Lipo-oligosaccharide (LOS) وبذلك يشابه هذه المركب ذلك الموجود في البكتريا السالبة لصبغة غرام من غير العائلة المعوية مثل *Neisseria* Spp. ، *Haemophilus* Spp. و*Bordetela* Spp. (Mills *et al.* 1992). والثاني عالي الوزن يعرف Lipopolysaccharide (LPS) ويكون مشابهاً للبكتريا السالبة لصبغة غرام من افراد العائلة المعوية (Aspinall *et al.* 1992).

تتميز منطقة اللب الخارجي في LOS بانها متنوعة جداً، ويعزى هذا التنوع الى الاختلاف في تركيب وارتباط السكريات الاحادية (Poly and Guerry, 2008). ويؤدي هذا التنوع الى التغاير المظهري الذي يمكن البكتريا من التهرب من دفاعات المضيف (Friis *et al.*, 2005). ان LOS في بكتريا *C. jejuni* فعال بايولوجياً ومناعياً (Moran, 2010) إذ يسبب الصدمة السمية (Endotoxic shock)، ويلعب دوراً مهماً في التصاق البكتريا الى هلام المخاط او الى الخلايا الظهارية المعوية. كما انه مسؤول عن استقرار الغشاء الخارجي وحماية الخلية من الضغوط البيئية (McSweegan and Walker 1986; Kanipes *et al*., 2007). وان وجود حامض الساليك في LOS يزيد من قابلية بكتريا *C. jejuni* على غزو الخلايا الظهارية المعوية (Louwen *et al*., 2008). كما يتميز LOS بقدرته على تحفيز تفاعل شوارتزمان (Shwartzman reaction) في الارنب (Ness and Hofstand,1987).

ان عديد السكريد الشحمي له القدرة على تنشيط المسار البديل للعامل المتمم (Alternative pathway) نتيجة ارتباط (Serum amyloid protein) بمنطقة الشحم إذ تمنعها من تنشيط المسار التقليدي للعامل المتمم (Dehaas *et al.*, 2000)، وأن $C_{3a}$ و $C_{5a}$ يسببان تحرر الهستامين (Histamine) مما يؤدي إلى توسع الأوعية الدموية وتحفيز الجذب الكيمياوي للخلايا العدلة (Neutrophils) وتجمعها في موقع الخمج مما يؤدي إلى حدوث الاستجابة الالتهابية (Reddy, 2010). كذلك يعمل عديد السكريد الشحمي كمستضد عديد النسيلة ومساعد مناعي (Adjuvant) بتحفيز الخلايا اللمفاوية البائية على انتاج الاجسام المضادة دون مساعدة الخلايا اللمفاوية التائية، (Wechsler-Reya and Monroe, 1996). كما يلعب عديد السكريد الشحمي دوراً مهماً في تحفيز الخلايا المناعية مثل الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage) وخلايا وحيدة النواة (Monocyte) والخلايا الشجيرية (Dentritic cells) على انتاج الحركيات الخلوية (Cytokines) مثل IL-1 و IL-6 و IL-8 وعامل التنخر الورمي Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) الذي يسهم في العمليات الالتهابية (Jones *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006a). وهنالك العديد من الجزيئات سواء كانت مستقبلات على سطوح الخلايا أو بروتينات رابطة لعديد السكريد الشحمي (LPS-binding proteins) لها بالغ الأهمية في توسط التداخل الحاصل بين عديد السكريد الشحمي والخلية الهدف، ومن أهم المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا هو TLR-4 و $CD_{14}$ والذي يوجد ايضا بشكل ذائب في بلازما الدم Soluble $CD_{14}$ ($sCD_{14}$)، ويسهم كلا الشكلين في توسط استجابة الخلايا لعديد السكريد الشحمي (Hailman *et al.*, 1994; Funda *et al.*, 2001).

**5- الذيفانات Toxins**

اثبتت الدراسات قدرة بكتريا *C. jejuni* على افراز نوعين من الذيفانات الخارجية (Exotoxins): ذيفانات معوية (Enterotoxins) وذيفانات خلوية (Cytotoxins) لها دور رئيس ومهم في الضراوة واحداث المرض (Florin and Antillon, 1992; Wassenar, 1997; Lee *et al,.* 2000) .

**١- الذيفانات المعوية Enterotoxins**

تعرف الذيفانات المعوية بانها بروتينات تفرزها البكتريا، لها القابلية على الارتباط مع مستقبلات خاصة على سطح الخلايا ثم تدخل الخلايا وترفع مستوى الادينوسين احادي الفوسفيت الحلقي cyclic Adenosine monophosphate (cAMP) او الكوانوسين احادي الفوسفيت الحلقي cyclic Guanosine monophosphate (cGMP) داخل الخلايا مما يؤدي الى الاسهال (Wassenar, 1997). ان اول من اشار الى ان بكتريا *C. jejuni* تنتج ذيفانات معوية هو Ruiz-Palacios وجماعته (1983) إذ وجدوا ان الراشح البكتيري له القابلية على تجميع السوائل في حلقة الأمعاء المربوطة للأمعاء الدقيقة للجرذ كما سبب

استطالة خط خلايا مبيض الهامستر الصيني CHO في الزجاج.

تنتج بكتريا *C. jejuni* ذيفان معوي حساسة للحرارة (Heat liable enterotoxin) يشابه بايولوجياً ومناعياً ذيفان الكوليرا (Cholera toxin) وذيفان بكتريا *E. coli* الحساس للحرارة (LT)، إذ يحفز هذا الذيفان إنزيم (Adenylate cyclase) الذي يحول ATP الى cAMP مما يزيد من مستوىcAMP داخل الخلايا وهذا بدوره يعمل على التقليل من امتصاص الصوديوم من قمة الزغابات المعوية ويزيد من افراز ايونات الكلوريد والكربونات والماء مما يسبب تجمع السوائل ومن ثم اسهال مائي، كما ان تأثير هذا الذيفان يمكن ان يعادل بالمصل المضاد لذيفان الكوليرا او ذيفان *E. coli* الحساس للحرارة (Klipstein and Engert, 1984, Collins *et al*., 1992). بينما أشارت أحد الدراسات إلى أن بكتريا *C. jejuni* لا تنتج الذيفان المشابهة لذيفان الكوليرا لكن التفاعل التصالبي بين بروتين الغشاء الخارجي مع الأضداد لذيفان الكوليرا يمكن أن يقود إلى الاعتقاد الخاطئ بأن بكتريا *C. jejuni* تنتج الذيفان المشابهة لذيفان الكوليرا (Albert *et al*., 2008). في حين استطاعت AL-Sibahea (2010) في دراسة محلية من استخلاص وتنقية الذيفان المعوي الحساس للحرارة من بكتريا *C. jejuni*.

**٢- الذيفانات الخلوية** **Cytotoxins**

تعرف الذيفانات الخلوية بانها بروتينات تقتل الخلية الهدف إذ تحدث ثقوباً في اغشية الخلايا او يكون فعلها داخل خلوي وتثبط تصنيع البروتينات الخلوية او تثبط تكوين خيوط الاكتين (Wassenar, 1997). تنتج بكتريا *C. jejuni* مجموعة من الذيفانات الخلوية التي تم تصنيفها على اساس سميتها لخطوط الخلايا الحيوانية والانسانية خارج الجسم الحي (Lee *et al*., 2000). من هذه الذيفانات تم تشخيص ذيفان بروتيني خلوي حساس للحرارة وزنه الجزيئي ٧٠ كيلودالتون له فعالية سمية تجاه خطوط الخلايا HeLa، HEp-2 ، MRC و CHO لكنه غير فعال تجاه خط الخلايا Vero (Guerrant *et al*., 1987; Pang *et al*.,1987). كما اشارت بعض الدراسات الى ان بكتريا *C. jejuni* تنتج ذيفان خلوي فعال وسام لخط الخلايا Vero لكنه غير فعال تجاه الخطوط الخلوية الاخرى (Klipstein *et al*. 1985; Johnson and Lior, 1986; Florin and Antillon, 1992).

اشار Johnson and Lior (1988) ان بكتريا *C. jejuni* تنتج ذيفان يعرف بـ Cytolethal distending toxin (CDT)، يتميز بفعاليته السمية تجاه خطوط الخلايا CHO، Vero، HeLa و-HEp 2 لكنه غير فعال تجاه خط خلايا الغدة الادرينالية Y-1. وقد ادى هذا الذيفان الى رفع مستوى cAMP في خط خلايا CHO وسبب استطالة هذه الخلايا بعد 24 ساعة من الحضن في الزجاج، وبعد 96 ساعة سبب

موت الخلايا مما يفرقه عن الذيفان المعوي الحساس للحرارة. يعمل هذا الذيفان على ايقاف تكامل طور G2 في دورة الخلية المعوية مما يحفز الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) في الخلايا المعوية (Lara-Tejero and Galan, 2001; Zheng, *et al.*, 2008). كما وجد ان هذا الذيفان يسبب ايقاف طور G2 في الخلايا اللمفاوية التائية والذي يساعد في تحوير الاستجابة المناعية ويزيد من قابلية البكتريا على الغزو (Purdy *et al.*, 2000).

وجد Moore وجماعته (1988) ان 11 عزلة من مجموع 36 عزلة لبكتريا *C. jejuni* انتجت ذيفان خلوي تمت معادلة تأثيره باستخدام المصل المضاد لذيفان الشيكلا لذلك اطلق عليه بالذيفان الشبيه بالشيكا (Shiga-like toxin)، لكن وراثياً لم يوجد تماثل للجين المشفر لذيفان الشيكلا في جينوم سلالات بكتريا *C. jejuni* المنتجة لهذا الذيفان (Wassenaar, 1997).

كما تنتج بعض سلالات بكتريا *C. jejuni* ذيفاناً خلوياً له فعالية تحليلية لخلايا الدم الحمر من مختلف الحيوانات يعرف بـ (Hemolysin)، وهذه تعد احد الاليات المهمة للحصول على الحديد كعامل مهم لتحفيز البكتريا على افراز انواع اخرى من الذيفانات (Hossain, 1993; Maisawa, 1995).

من الذيفانات الخلوية التي تنتجها بكتريا *C. jejuni* هو الذيفان الكبدي (Hepatotoxin). فقد وجد Kita وجماعته (1990) ان بعض عزلات بكتريا *C. jejuni* المعزولة من حالات الاسهال المائي واخرى معزولة من الاسهال الدموي وعزلات معزولة من اشخاص لم تظهر عليهم اعراض الاصابة (Asymptomatic) سببت التهاب الكبد (Hepatitis) عند حقنها في الفئران. كما وجد أن هذه السلالات تنتج ذيفاناً خلوياً ساماً لخط الخلايا الكبدية للفئران في الزجاج لكنه غير فعال تجاه خط الخلايا CHO او Y1 ، وان حقن المستخلص الخام او النقي لهذا الذيفان في الفئران سبب افات كبدية مماثلة للآفات التي حدثت بعد استعمار الكبد بسلالات بكتريا *C. jejuni* المنتجة لهذا الذيفان، كما وجد ان هذا الذيفان حساس للحرارة وحساس لإنزيم التربسين ومرتبط مع مكونات الغشاء الخارجي (Kita *et al.*, 1990; Kita *et al.*, 1992).

**6- استهلاك الحديد Iron utilizing**

ان اهمية الحديد في إمراضية بكتريا *C. jejuni* لا يمكن تجاوزها فهو عنصر اساسي للنمو ويلعب دوراً مهماً في تحفيز العديد من التفاعلات الايضية بوصفه عاملاً مساعداً للعديد من الانزيمات كما يستخدم في نقل الالكترون وتفاعلات الاكسدة، ووجد ان هذه البكتريا عندما تنمو في وسط قليل الحديد يؤدي الى ضعف معدل النمو وتغيير مظهرها وقلة انتاجها للذيفانات (McCardell *et al.*, 1986b; Andrews *et al.*, 2003). لذلك تحتاج البكتريا الى الحديد الموجود في المضيف وبذلك تنافس البروتينات الخازنة والمرتبطة بالحديد مثل (Transferrin) و(Lactoferrin) الموجودة في المضيف، ولكي تحصل البكتريا على الحديد فأنها تنتج مركبات تسمى (Siderophore) لها القابلية على الارتباط بالحديد اكثر من بروتينات المضيف،

وتنقله عبر الغشاء الخلوي (Ratledge, 2007). وقد وجد ان بعض سلالات بكتريا *C. jejuni* لا تنتج مركبات (Siderophore) مثل (Enterochelin) و (Ferrichrome)، الا انها تمتلك مستقبلات على سطوحها لهذه المركبات وبذلك تحصل على مركبات (Siderophore) من البكتريا الاخرى التي تتواجد في الامعاء (Field *et al*., 1986; Poly and Guerry, 2008).

تمتلك بكتريا *C. jejuni* عدة مستقبلات وانظمة لاستهلاك الحديد (Palyada *et al.*, 2004). وقد وجد ان تطفير الجينات المسؤولة عن هذه الانظمة يضعف من قابلية هذه البكتريا على العيش داخل خطوط الخلايا الظهارية المعوية في الزجاج ويضعف من قابليتها على استعمار الدجاج وصغار الخنازير (Naikare *et al*., 2008). كما تنتج بكتريا *C. jejuni* بروتيناً خازناً للحديد يعرف بـ (Ferritin) يعمل على حماية البكتريا من الصدمة التأكسدية (Oxidative stress) (Ketley, 1997).

**7- بلازميد الضراوة** **Virulence plasmid (p. vir)**

وجد Bacon وجماعته (2002) ان هناك بلازميداً اطلق عليه بلازميد الضراوة موجوداً تقريبا في السلالات ذات الامراضية والضراوة العالية ومرتبط مع حدوث الاسهال الدموي ويعد مهماً جداً، اذ انه من خلال دراسة خط الخلايا خارج الجسم للأرانب والفئران تبين دوره المميز في الالتصاق والاجتياح للخلايا الظهارية المعوية، فالسلالات الحاوية عليه تسبب للمضيف اصابة ممرضة ولاسيما عند الدراسة المختبرية البحثية، كما لوحظ عدم حصول هذه الاصابة بشكل شديد وحاد عند تطفير السلالات الحاوية على هذا البلازميد (Bacon *et al*., 2002; Dobryan *et al*., 2005).

**8- مستضدات الغزو** ***Campylobacter* invasive antigens**

تفرز بكتريا *C. jejuni* مجموعة من البروتينات تعرف بمستضدات الغزو *Campylobacter* invasive antigens (Cia) لها دور في غزو الخلايا الظهارية (Konkel *et al.*,1999a). يتم افراز هذه البروتينات من خلال نظام الاسواط الافرازي الذي ينتمي الى نظام الافراز من النوع الثالث (Type III secretion system) والذي يمكن البكتريا من حقن هذه البروتينات مباشرة في هيولي الخلية المضيف (Konkel *et al*., 1999b; Guerry, 2007).

## ٢-١٠ قابلية بكتريا *C. jejuni* على دخول واستيطان والبقاء داخل خلايا المضيف

يتم دخول بكتريا *C. jejuni* إلى داخل جسم الكائن الحي عادة عن طريق ابتلاع الغذاء او الماء الملوث الحاوي على الجرعة المناسبة لإحداث الإصابة، تلك الجرعة التي تتغاير باختلاف السلالة البكتيرية واستعدادية المضيف للإصابة او باختلاف الوسيلة الناقلة للبكتريا. فقد اشارت بعض الدراسات الى ان حوالي 500 خلية بكتيرية كافية لإحداث الاصابة بالإسهال في حال تناول متبرعين (Human volunteers) الحليب غير

المبستر (Black *et al*., 1988; Katarzyna *et al*., 2009). بينما في دراسة اخرى على متبرعين بلغت الجرعة الممرضة $10^6$خلية بكتيرية (Walker *et al*., 1986).

تستعمر بكتريا *C. jejuni* الطبقة المخاطية للأمعاء الدقيقة، اذ لها القدرة على العيش والتضاعف في المناطق الخارجية من الطبقة المخاطية التي تبطن سطح الامعاء، كما تتعمق البكتريا في الطبقة المخاطية لتصل الى جريبات لاييبركن (Crypts of Lieberkuhn) المملوءة بالمادة المخاطية ويتم استعمار هذه المنطقة من التجمعات الكثيفة (Lee *et al*., 1986;Janssen *et al*., 2008). ان بكتريا *C. jejuni* لها القدرة على الارتباط النوعي مع الطبقة المخاطية وان انجذابها الى هذه الطبقة يعود الى احتواء البروتين السكري المكون للمخاط الميوسين (Mucin) في نهايته السكرية على الفيوكوز (L-fucose) كما يحتوي على السيرين (L-serine) اللذين يعملان كمحفزات كيميائية (Chemotactic stimuli) تجتذب بكتريا *C. jejuni* مما يوجه حركة هذه البكتريا ويزيد من كفاءة استعمار الطبقة المخاطية للأمعاء (Ketley, 1997; Allos, 2001). تستعمر بكتريا *C. jejuni* في البداية الطبقة المخاطية للأمعاء الدقيقة ثم تتحرك تجاه الامعاء الغليظة، وان مناطق التلف النسيجي الذي تحدثه هذه البكتريا تتضمن الاثني عشر والصائم فضلاً عن الضرر الذي تحدثه لأنسجة الامعاء الغليظة، وتتميز بكتريا *C. jejuni* بانها تستغل الطبقة المخاطية كنموذج بيئي لتحوير التعبير عن جينات مرتبطة بالضراوة (Tu *et al*., 2008).

تحتاج بكتريا *C. jejuni* الى الحركة في اختراق الحاجز المخاطي المعوي واستعمار الطبقة المخاطية وللوصول الى مناطق الالتصاق على الخلايا الظهارية المعوية واختراق هذه الخلايا وبذلك تزيد من التركيز الموضعي للنواتج البكتيرية السامة (Nuijten *et al*., 1990). كما تساعدها الحركة في تجنب المستويات الواطئة من الأس الهيدروجيني للمعدة والتمعج المعوي، ويساعدها في حركتها شكلها الحلزوني وامتلاكها للسوط القطبي (Nachamkin *et al*., 1993).

يعد الالتصاق من الخطوات الأولى للاستعمار ولأجل حدوث الالتصاق يجب أن يحدث التداخل الجزئي بين اللاصقات البكتيرية وبين المستقبلات الموجودة على سطح خلايا أنسجة المضيف. ومن هنا تظهر اهمية الالتصاق في تحديد كفاءة الاستعمار. إذ تمتلك بكتريا*C. jejuni* عدد من التراكيب لها دور مهم في الالتصاق النوعي مع مستقبلات الارتباط السكرية (Glycoconjugate) الموجودة في هلام المخاط او في الحافة الهلبية (Brush border) للخلايا الظهارية المعوية، مثل بروتينات الغشاء الخارجي وعديد السكريد الشحمي والاسواط (Konkel *et al*., 2001; Lamb-Rosteski *et al*., 2008). ان التصاق بكتريا *C. jejuni* الى الظهارة المعوية واستعمار الطبقة المخاطية يؤدي الى اضطراب جزئي للنبيت الطبيعي المعوي وانخفاض المقاومة الكهربائية عبر الخلايا الظهارية (Trans-epithelial electrical resistance)، واعادة توزيع بروتين

(Occluding) المسؤول عن الارتباطات الوثيقة بين الخلايا الظهارية وتنشيط مسارات NF-κB و MAPK مما يؤدي الى سوء الامتصاص والاسهال (MacCallum *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Hanning *et al.*, 2008).

تعد بكتريا *C. jejuni* من النوع الغازي (An invasive species) ، إذ وجدت العديد من الدراسات من خلال استخدام المجهر الالكتروني او الدراسات على خطوط الخلايا في الزجاج ان هذه البكتريا تمتاز بقابليتها على غزو مختلف خلايا المضيف وعلى البقاء والتضاعف داخل الخلايا الظهارية المعوية والخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage)، وان هذه القابلية هي احد الاسباب المهمة لحدوث تجرثم الدم خلال الاصابة بهذه البكتريا، لذا صنفت هذه البكتريا واحدة من الجراثيم اختيارية داخل خلوية (Facultative intracellular) (Konkel *et al*., 1992; Babakhani, *et al*., 1993; Dasti, 2007;Li *et al*., 2008).

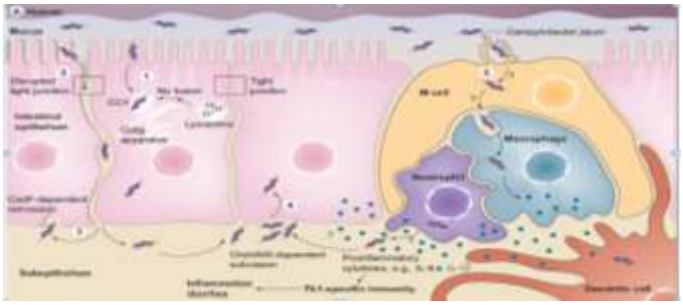
تغزو بكتريا *C. jejuni* الخلايا الظهارية المعوية من خلال عملية تشبه عملية البلعمة المعتمدة على نبيبات دقيقة تعرف بـ (Microtubule - dependent endocytosis) ومن الممكن انها تحور مسارات نقل الاشارة (Signal transduction pathways) داخل الخلايا الظهارية المعوية مؤدية الى اعادة نسق الهيكل الخلوي مما يسهل لهذه البكتريا دخول وعبور الخلايا الظهارية احادية الطبقة (Wooldridge *et al.*, 1996; Kopecko *et al*., 2001). في البداية تلتصق بكتريا *C. jejuni* الى السطح العلوي للخلية الظهارية حول منطقة الارتباط بين الخلايا (Peri-junctional region) ثم تفرز عوامل غزو مؤثرة تحفز فسفرة مجموعة من بروتينات الخلية المضيف وتحرير ايونات الكالسيوم من المخزن الخلوي وتحفيز انزيم inosilot Phosphotidyl -3 kinase (PI3-K) (Biswas *et al*., 2003). ان تحفيز مسار اشارات داخل الخلايا المعوية يؤدي الى عرقلة موضعية وانحلال لخيوط الأكتين وامتداد نبيبات دقيقة لتكوين بروزات غشائية تلاقي البكتريا المجاورة لها (Kopecko *et al*. 2001)، وقد اشارت بعض الدراسات عند استخدام خطوط خلايا Caco-2 الى مشاركة (Caveolae) في دخول ونقل بكتريا *C. jejuni* وهي عبارة عن انبعاجات صغيرة سطحية للغشاء البلازمي غنية بالشحوم والبروتينات وهي نوع خاص من الشحم الطائف (Lipid raft) توجد في العديد من انواع الخلايا الفقارية ومنها الخلايا الظهارية المعوية(Schnitzer *et al.*, 1994). ان تداخل البكتريا مع الخلية الظهارية المعوية عند (Caveolae) يؤدي الى تجعد الغشاء الخلوي (Membrane ruffling) ومن ثم ابتلاع الخلايا الظهارية للبكتريا بعملية (Endocytosis) (Wooldridge and Ketley, 1997)، وتنتقل البكتريا المبتلعة وتعيش داخل فجوات محاطة بأغشية وتتحرك على طول نبيبات دقيقة بالتعاون مع بروتين الحركة الخلوي (Dynein) وهذا يساعد البكتريا على التغلب وتجاوز اندماج الفجوات الموجودة فيها مع الجسيمات الحالة (Lysosomes) الموجودة في هيولي الخلية (Hu and Kopecko, 1999; Watson

(and Galan, 2008. ثم تنتقل هذه الفجوات الى السطح القاعدي للخلايا الظهارية لتحرر البكتريا بعملية (Exocytosis) الى منطقة الصفيحة الاساسية (Hu *et al.*, 2008). تعاني الخلية الظهارية المصابة ببكتريا *C. jejuni* من انتفاخ في هيول الخلية وفقدان للزغابات الدقيقة ومن ثم ضمور وموت خلوي مبرمج بسبب التأثيرات السامة للبكتريا مما يؤدي الى عرقلة الظهارة المعوية ومن ثمّ حدوث الاسهال الالتهابي الدموي (Russell *et al.*, 1993; Al-Banna *et al.*, 2008;Van Deun *et al.*, 2008). وقد وجد ان السلالات المعزولة من حالات الاسهال الدموي الشبيه بالدزنتري (Dysentery-like illness) تكون من النوع الغازي واكثر سمية من السلالات المعزولة من الاسهال المائي (Mahajan and Rodgers, 1990) .

اشار van Alphen وجماعته (2008) الى وجود الية اخرى لغزو بكتريا *C. jejuni* للخلايا الظهارية يطلق عليها بـ (Subvasion) والتي تتضمن هجرة البكتريا السريعة الى الفراغ تحت الخلايا الظهارية وغزو هذه الخلايا من خلال سطحها القاعدي (Basolateral). ان حدوث هذا النوع من الغزو يتطلب وجود بكتريا *C. jejuni* في الفراغ تحت الخلايا الظهارية وقد اشارت الدراسات الى قابلية بكتريا *C . jejuni* على الانتقال (Translocation) بين الخلايا الظهارية (Paracellular) الى الفراغ تحت الخلايا من خلال قابليتها على عرقلة الارتباطات الخلوية الوثيقة (MacCallum *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). كما لوحظ في الارنب ان هذه البكتريا تستعمل خلايا M cell الواقعة في النسيج الظهاري الموجود فوق لطخ باير (Payers patches) للانتقال الخلوي (Transcytosis) الى الفراغ تحت الخلايا (Walker *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 2008). وبين Monteville and Konkel (2002) ان غزو بكتريا *C. jejuni* للخلايا الظهارية من خلال السطح القاعدي يبدأ بارتباط بروتينها الخارجي cadF مع المستقبل (Fibronectin) الموجود على السطح القاعدي للخلايا الظهارية. أن عمليتي الانتقال والغزو عمليتان منفصلتان إذ إن الجينات التي تشفر للعوامل المسؤولة عن الانتقال في بكتريا *C. jejuni* مختلفة عن تلك المسؤولة عن الغزو (Konkel *et al.*, 2001).

وجد Kiehlbauch وجماعته (1985) ان بكتريا *C. jejuni* تستطيع العيش لمدة 6–7 ايام داخل الخلايا البلعمية الكبيرة مع تحول بعض الخلايا الى الشكل الكروي. ووجد ان حقن الفئران بعزلة سريرية لبكتريا *C. jejuni* بعد استنزاف الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage depletion) ادى الى زيادة نسبة الموت (Mortality) في البكتريا (Ketley, 1997)، مما يؤكد دور هذه الخلايا في دعم بقاء هذه البكتريا ونشرها داخل الجسم (Sikic *et al.*, 2009). في حين وجد Wassenaar وجماعته (1997) ان 10% فقط من الخلايا وحيدة النواة المحيطية فشلت في قتل بكتريا *C. jejuni* بعد عملية البلعمة، واشار الى ان هذا الفشل هو السبب في التعرض للإصابة بتجرثم الدم. كما استطاع Day وجماعته(2000) من عزل بكتريا *C. jejuni*

من خلايا (Porcine peritoneal macrophages) و (Murine peritoneal macrophages) بعد 6 ايام من عملية البلعمة في الزجاج. وذكر ان العامل الذي ساعد على بقاء هذه البكتريا هو انتاجها لإنزيم الكاتليز القادر على ازالة سمية بيروكسيد الهيدروجين الناتج داخل هذه الخلايا بعملية الانفجار التنفسي (Respiratory burst) ، إذ لم يستطع الباحث ان يعزل السلالة المطفر فيها الجين المسؤول عن انتاج هذا الانزيم بعد 24 ساعة من عملية البلعمة. اما بقاء هذه البكتريا داخل الخلايا الظهارية المعوية فانه يعتمد على انتاج هذه البكتريا إنزيم (Superoxide dismutase) وليس انزيم الكاتليز (Pesci *et al*., 1994). كما اشار Elvers وجماعته (2004) ان بكتريا *C. jejuni* تعبر عن جين مستحث يسمى *Cgb* يعمل ناتجه على ازالة سمية اوكسيد النتريك $NO^-$ الذي تنتجه الخلايا الظهارية. واثبتت دراسات اخرى ان بكتريا *C. jejuni* تصيب الخلايا وحيدة النواة وتسبب الموت الخلوي المبرمج بفعل انتاجها لذيفان CDT (Siegesmund *et al.*, 2004; Hickey *et al.*, 2005).



**شكل (2-2) اليات دخول وانتقال بكتريا *C. jejuni* الى الخلايا الظهارية المعوية وتحفيز الاستجابة المناعية (Katarzyna *et al*., 2009).**

## ٢-١١الاستجابة المناعية لبكتريا *C. jejuni*

### ١- المناعة العفوية Innate immunity

تلعب الخلايا الظهارية المعوية عند الاصابة ببكتريا *C. jejuni* دوراً مهماً في البدء باستجابة مناعية عفوية مثل انتاج الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب (Proinflammatory cytokines) والببتيدات المضادة للجراثيم (Antimicrobial peptides) وحث انتاج اوكسيد النتريك (Eckmann, 2005).

ان البدء بالاستجابة المناعية العفوية يتطلب التداخل بين مستقبلات موجودة على سطح خلايا المضيف تعرف بمستقبلات التمييز النمطية Pattern-recognition receptors (PRRs) مع انماط جزيئية مرتبطة بالممرض Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). ويعد TLR و-Nucleotide

binding oligomerization domain (NODs) من الامثلة على هذه المستقبلات (Akira *et al.*, 2006). ان تنشيط مستقبلات TLR يؤدي الى تحفيز مسار عامل الاستنساخ NF-κB الذي ينظم التعبير عن جينات تشفر الى مجموعة من الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب، وتنشط مستقبلات TLR5 الموجودة على سطح الامعاء عند تمييز الأسواط الا انها عاجزة عن تمييز اسواط بكتريا *C. jejuni* وذلك لفقدان هذه الاسواط الجزيئات الاساسية التي تميزها المستقبلات (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). كما ان مستقبلات TLR9 عاجزة ايضاً عن تمييز بكتريا *C. jejuni* لقلة نسبة الكوانين والسايتوسين في جينوم هذه البكتريا (Dalpke *et al.*, 2006). في حين تنشط مستقبلات TLR4 عند تمييزها لعديد السكريد الشحمي لهذه البكتريا مما يؤدي الى انتاج الحركيات الخلوية (Hu *et al*, 2006a). كما وجد ان مستقبلات NOD-1 الموجودة في سايتوبلازم الخلايا الظهارية والتي تميز الببتدوكلايكان مهمة في تحفيز استجابة عفوية تجاه بكتريا *C. jejuni* (Zilbauer *et al.,* 2007).

اضافة الى مستقبلات PRRs وجد ان ارتباط بروتين الصدمة الحرارية Heat shock protein 90(Hsp 90) الموجود على سطح الخلايا الظهارية مع بروتين الغشاء الخارجي JlpA لبكتريا *C. jejuni* يحفز مسار عامل الاستنساخ NF-κB ومسار MAPK مما يؤدي الى انتاج الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب (Jin *et al.*, 2003). كما وجد ان غزو الخلايا الظهارية المعوية ببكتريا *C. jejuni* او انتاج البكتريا لذيفان CDT يؤدي الى تنشيط مسار MAPK مثل p38 و ERK مما يؤدي الى تحفيز انتاج الحركيات الخلوية (Hu *et al.*, 2006b) . ويعد IL-8 من اهم الحركيات الخلوية التي تنتجها الخلايا الظهارية استجابة لبكتريا *C. jejuni* (Hickey *et al.*, 1999; Hickey *et al.*, 2000).

ينتمي IL-8 الى عائلة الحركيات الكيميائية (Chemokines) وظيفتها الجذب الكيميائي. إذ يعمل كإشارة كيميائية تجتذب الخلايا العدلة الى موقع الاصابة، لذا يطلق عليه بالعامل الجاذب للخلايا العدلة (Neutrophil chemotactic factor). كما يعمل على اجتذاب الخلايا القعدة والخلايا اللمفاوية التائية الى موقع الاصابة (Dibb *et al.*, 1992). يعمل IL-8 على تنشيط الخلايا العدلة وزيادة فعاليتها البلعمية من خلال زيادة مستويات الكالسيوم الداخلية وتحفيز تحرير الانزيمات من حبيبات الجسيمات الحالة وزيادة انتاج جذور الاوكسجين بعملية الانفجار التنفسي لذ يطلق عليه البروتين المنشط للخلايا العدلة (Neutrophil activating protein) (van-Damme *et al.*, 1992). كما يحفز الخلايا العدلة على التعبير عن جزيئات الالتصاق السطحية CD11/CD18، وعلى الالتصاق الى البطانة الوعائية، فضلاً عن انه عامل وعائي قوي (Angiogenic factor). وينتج IL-8 من العديد من الخلايا استجابة للمحفزات الخارجية مثل عديد السكريد الشحمي والفايروسات او استجابة للمحفزات الداخلية كالتعرض للحركيات الخلوية السابقة

للالتهاب مثل IL-1 و TNF-α، إذ ينتج من الخلايا وحيدة النواة والخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا العدلة والخلايا الظهارية والارومة الليفية الجلدية والخلايا البطانية والخلايا الكبدية والخلايا الكيراتينية والخلايا الغضروفية، كما يمكن ان ينتج من بعض خطوط الخلايا السرطانية (Kotband Calandra, 2003).

ان انتاج الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب مثل Interferon gamma (IFN-γ), IL-8, TNF-α, IL-2 و IL-1β استجابة لبكتريا *C. jejuni* لا يؤدي الى ازالة البكتريا فقط وانما يسبب حدوث حالة الاسهال من خلال دور هذه الحركيات في جذب الخلايا العدلة وتجمعها في موقع الاصابة اضافة الى جذب الخلايا البلعمية الكبيرة النشطة، وتثبيط الوظيفة الامتصاصية للخلايا الظهارية المعوية وعرقلة الارتباطات الخلوية الوثيقة مما يؤدي الى الاسهال (Al-Banna *et al.*, 2008; MacCallum *et al.*, 2005; Zilbauer *et al.*, 2008).

تنتج الخلايا الظهارية عند الاصابة ببكتريا *C. jejuni* (β-defensins) وهو من الببتيدات المضادة للجراثيم وله اهمية كبيرة في حماية السطح المخاطي المعوي من خلال فعاليته القاتلة للبكتريا (Bactericidal) اضافة الى فعاليته الجاذبة ودوره كمحور مناعي (Immunomodulator) (Zilbauer *et al.*, 2005).

اشار Walan وجماعته (1992) الى ان المتمم يساعد في عملية الاستساغة (Opsonization) لهذه البكتريا للمساعدة في القضاء عليها بعملية البلعمة، في حين اشارت دراسة اخرى الى ان الاضداد المناعية المتكونة نتيجة التفاعل التصالبي بين مستضدات هذه البكتريا ومستضدات البكتريا العصوية السالبة لصبغة غرام هي التي تساعد في عملية الاستساغة وليس المتمم (Perez-Perez *et al*., 1986).

**شكل (2–3) تحفيز الخلايا الظهارية على انتاج الحركيات الخلوية استجابة لبكتريا *C. jejuni* (Katarzyna *et al*., 2009)**

تلعب الخلايا العدلة والخلايا البلعمية الكبيرة دوراً في الاستجابة المناعية العفوية ضد الاصابة بهذه

البكتريا فهي ترتشح الى الانسجة المخاطية المصابة (Stewart-Tull *et al*., 2009). وان التداخل بين بكتريا *C. jejuni* والخلايا العدلة يؤدي الى ابتلاع هذه البكتريا وانتاج انواع الاوكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species) التي قد تؤدي الى قتل البكتريا بالاعتماد على درجة الحث (Wooldridge and Ketley, 1997). اما الية قتل هذه البكتريا عند ابتلاعها من الخلايا البلعمية الكبيرة فتعتمد على انتاج انواع الاوكسجين والنتروجين التفاعلية (Reactive nitrogen species) بعد تحفيز هذه الخلايا بالحركيات الخلوية مثل IFN-γ (Iovine *et al.*, 2008). في حين اشارت بعض الدراسات كما اوضحنا سابقا الى ان بكتريا *C. jejuni* قادرة على البقاء والعيش داخل الخلايا البلعمية الكبيرة وخلايا وحيدة النواة لعدة ايام (Kiehlbauch *et al*., 1985;Day *et al.*, 2000).

**2- المناعة الخلطية Humoral immunity**

تنشأ عند معظم الاشخاص المصابين ببكتريا *C. jejuni* استجابة مناعية خلطية تجاه هذه البكتريا (Blaser *et al.*, 1985; Blaser *et al.*, 1986; Mizuno *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1989)، كما أظهرت الدراسات التجريبية في الحيوانات المختبرية والانسان وجود استجابة مناعية خلطية تجاه مستضدات هذه البكتريا (Black *et al*., 1988; Russell *et al*., 1989). إن مستضدات بكتريا *C. jejuni* التي تحفز تكوين الأجسام المضادة تتمثل بعوامل الضراوة السطحية لهذه البكتريا ومنها المستضد السوطي وبروتينات الغشاء الخارجي والمحفظة (Ruiz - Palacios *et al*., 1981; Nachamin and Yang, 1989; Huang *et al.*, 2007). كما لوحظ ارتفاع مستويات الاجسام المضادة ولاسيما IgG في امصال الاشخاص المصابين ببكتريا *C. jejuni* والتي تكون نوعية لمستضد عديد السكريد الشحمي مقارنة مع مصل الاشخاص غير المصابين كسيطرة (Blaser, 1992; Guerry *et al.*, 2000). كذلك لوحظ أن الذيفان المعوي الحساسة للحرارة LT يحفز توليد اضداد تعادل الذيفان (Ruiz - Palacios *et al*., 1985)، في حين وجد ان الذيفانات الخلوية المنتجة من هذه البكتريا مثل CDT تحفز توليد أضداد تعادل الذيفان في جسم الإنسان لكن لا تعادل الذيفان في الدجاج (Abuoun *et al*., 2005).

تظهر الاجسام المضادة في مصل الشخص المصاب ببكتريا *C. jejuni* خلال الاسبوع الثاني بعد ظهور علامات الاصابة ثم ترتفع بسرعة، إذ يرتفع مستوى الضد IgA ويبلغ ذروته بعد ٧ – ١٠ أيام من ظهور الاعراض، ويبلغ مستوى الضد IgG ذروته بعد ٣–٤ أسابيع، كما لوحظ انخفاض مستويات الاضداد IgA و IgM وبقاء مستوى الضد IgG مرتفعاً لمدة طويلة بعد الاصابة الحادة (Blaser *et al*., 1984; Walker *et al*., 1986; Cawthraw *et al*., 2002; Janssen *et al*., 2008). وجد ارتفاع في مستوى الضد IgG إلى أربعة أضعاف في مصل الشخص المصاب مقارنة بأمصال أشخاص أصحاء (Blaser, 1983a). كما

لوحظ وجود اجسام مضادة في سوائل الامعاء ولاسيما الضد الإفرازي sIgA في الاشخاص المصابين بهذه البكتريا وفي الاصابة التجريبية في الحيوانات (Burr *et al.*, 1988; Tribble *et al.*, 2010).

تشير بعض الدراسات الوبائية إلى دور المناعة الخلطية في توفير الحماية ضد الإصابة ببكتريا *C. jejuni* بدلالة ان الأشخاص الذين يعانون من نقص في انتاج الاضداد المناعية اكثر حساسية للإصابة (Janssen *et al.*, 2008). ان أول الية للمناعة الخلطية تواجه هذه البكتريا عند الاصابة هي الضد الإفرازي sIgA، وقد اشارت بعض الدراسات الى ارتباط هذا الضد والضد المصلي IgA بالحماية ضد المرض (Megraud, *et al.*, 1990; Ruiz - Palacios *et al.*, 1990). واشارت دراسة في المكسيك الى أن الأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية أقل عرضة للإصابة ببكتريا *C. jejuni* وذلك للدور الذي يلعبه sIgA في حليب الأم في حماية الاطفال الرضع من الإصابة بهذه البكتريا (Ruiz - Palacios *et al.*, 1990). كما وجد في دراسة ان الأشخاص ضعيفي المناعة يتعرضون لإصابات متكررة بهذه البكتريا وان إعطاءهم sIgA عن طريق الفم أدى إلى التخلص الكامل من البكتريا (Hammarstrom *et al.*, 1993). وعلى الرغم من اهمية الضد IgA، لم تشير الدراسات الى ان الاشخاص الذين يعانون من نقص في هذا الضد (IgA deficiency) يكونوا اكثر عرضة للإصابة ببكتريا *C. jejuni*، وهذا يشير الى وجود اليات اخرى للتعويض عن نقص IgA، فضلاً عن إن وجود sIgA في حليب الأم يصاحبه وجود IgG في مصل الطفل الرضيع والذي انتقل من الأم إلى الطفل عبر المشيمة خلال فترة الحمل مما يشير الى ان حماية الاطفال الرضع قد ترتبط بوجود الضد IgG (Janssen *et al.*, 2008).

وجد ان الأشخاص المصابين بفقر كلوبيولين كاما (Hypogammaglobulinemia) كانوا يعانون من اصابات حادة ومستمرة ببكتريا *C. jejuni*، وظهر أن اعطاءهم مستحضراً يحتوي على IgM نوعياً لبكتريا *C. jejuni* ادى الى الشفاء من الاصابة بصورة كاملة (Borleffs *et al.*, 1993). وهذا متوافق مع فرضية أن زيادة إنتاج IgM هو احد آليات التعويض المناعي للأشخاص الذين يعانون من نقص في IgA فضلاً عن وجود آلية فعالة لإفراز IgM على السطوح المخاطية (Brandtzaeg, 1981). كما أن IgM أكثر كفاءة في تثبيت المتمم بمقدار ٢٠٠ مرة من IgG، ومقارنة بـIgG فإن IgM ينشط الفعالية البلعمية للخلايا متعددة أشكال النوى من خلال زيادة إنتاج جذور الأوكسجين وتحفيز الفعالية القاتلة للبكتريا (Autenrieth *et al.*, 1995).

اما دور IgG في الحماية فيمكن ملاحظته ايضا في الاشخاص الذين يعانون من فقر كلوبيولين كاما، كما ان مستوى IgG يبقى مرتفعاً لمدة طويلة مقارنة بـIgM و IgA بعد الإصابة بهذه البكتريا (Stird *et al.*, 2001; Cawthaw *et al.*, 2002). ايضا لوحظ وجود مستويات عالية من الضد IgG النوعي لبكتريا *C. jejuni* ومستويات طبيعية من الاضداد IgM و IgA في مصل الاشخاص الذين يستهلكون الحليب الخام

بصورة مستمرة مع قلة تعرضهم للإصابة مقارنة مع الاشخاص الذين يتناولون الحليب الخام لأول مرة مما يشير الى دور الضد IgG في الحماية من الاصابة بهذه البكتريا (Blaser *et al*., 1987). كما وجد Blaser وجماعته (1983b) ان وجود مستويات عالية مبكرة (في الاسبوع الاول) من الضد IgG في مصل الفئران المصابة تجريبياً ببكتريا *C. jejuni* نتيجة تشابه المحددات المستضدية لهذه البكتريا مع البكتريا الاخرى كان السبب في حماية الفئران من الاسهال.

**٣- المناعة الخلوية Cellular immunity**

اظهرت العديد من الدراسات في الانسان والحيوانات وفي الزجاج باستخدام خطوط الخلايا ان المناعة المتوسطة بالخلايا (Cell mediated immunity) مهمة في توفير الحماية ضد الاصابة ببكتريا *C. jejuni*، إذ تعد الخلايا الشجيرية (Dendritic cells) الخلايا المفتاح في نشوء استجابة الخلايا اللمفاوية التائية $CD4^+T$ cell من خلال تعبيرها عن مستضدات الصنف الثاني من معقد التوافق النسيجي Major histocompatibility complex-II (MHC-II) وجزيئات التحفيز (Co-stimulatory molecules) اضافة الى انتاجها لمستويات عالية من الحركيات الخلوية IL-12, TNF-α وIL-6، وان وجود مستويات عالية من IL-12 يحفز تمايز الخلايا التائية المساعدة T-helper ($CD4^+$) إلى الخلايا التائية المساعدة من النوع الأولTh-1 للسيطرة على الاصابة بهذه البكتريا في السطوح المخاطية (Chang and Miller, 2006; Rathinam *et al*., 2009).

يعاني الأشخاص المصابين بالإيدز من اصابات جهازية ومعوية متكررة سببها بكتريا *C. jejuni*، ومن المعروف ان هؤلاء الاشخاص يعانون من اختزال ملحوظ في مستوى الخلايا اللمفاوية التائية $CD4^+T$ cell وهذه يدل على اهمية المناعة المتوسطة بالخلايا في الحماية ضد الإصابة بهذه البكتريا، على الرغم من أن استجابة الخلايا اللمفاوية البائية وتكوين الأجسام المضادة يمكن أن تضعف ايضاً في المصابين بالإيدز (Janssen *et al*., 2008). واشارت دراسة اخرى الى وجود حث للاستجابة الخلوية عند مرضى مصابين ببكتريا *C. jejuni* ووجود زيادة في مستوى خلايا الدم وحيدة النواة المحيطية، بالإضافة إلى الحث المبكر لإنتاج الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب (Baqar *et al*., 2001).

اشار Johanesen الى ان اصابة خط الخلايا الظهارية T84 ببكتريا *C. jejuni* يؤدي الى انتاج هذه الخلايا للحركي الخلوي CCL20 الذي يعمل كجاذب للخلايا الشجيرية التي تعد المفتاح الذي يربط الاستجابة المناعية العفوية مع الاستجابة المناعية التكيفية (Adaptive immune response) (Johanesen and Dwinell, 2006). كما ان تداخل بكتريا *C. jejuni* مع الخلايا الشجيرية المشتقة من الخلايا وحيدة النواة المحيطية في الزجاج يحفز هذه الخلايا على انتاج الحركيات الخلوية IL-1, IL-6, IL-8, 1L-10, TNF-α

وIL-12 وان الارتفاع الملحوظ للحركي الخلوي IL-12 يحفز تمايز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة T-helper ($CD4^+$) إلى الخلايا التائية المساعدة من النوع الأولTh-1 المهمة في السيطرة على الإصابة (AL-Solloom *et al*., 2003; Hu *et al*., 2006b).

ينتج IL-12 من الخلايا الشجيرية وخلايا وحيدة النواة والخلايا اللمفاوية البائية استجابة للمحفزات المستضدية، ويعد IL-12 من أهم الحركيات الخلوية السابقة للالتهاب لأهميته في تنظيم الآليات المناعية الآنية إضافة إلى دوره في تحديد نوع الاستجابة المناعية التكيفية (Kotb and Calandra, 2003). ينتج IL-12 عند الإصابة ببكتريا *C. jejuni* بصورة رئيسية من تنشيط الخلايا الشجيرية، إذ يعمل IL-12 على تنظيم تمايز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة T-helper ($CD4^+$) إلى الخلايا المساعدة من النوع الأولTh-1 التي تنتج الحركيات الخلوية أهمها إنتاج INF-γ الذي ينشط الخلايا البلعمية الكبيرة المصابة ببكتريا *C. jejuni* ويحفز فعاليتها الخلوية لقتل البكتريا المبتلعة (Abram *et al.*, 2000; Rathinam *et al*., 2008; Rathinam, *et al* 2009). وقد لوحظ في دراسة تجريبية على متبرعين بعد اصابتهم ببكتريا *C. jejuni* وجود تراكيز عالية من الحركي الخلوي INF-γ في خروج المصابين (Tribble *et al*., 2010). كما لوحظ في دراسة تجريبية عند اصابة الفئران بسلالة من الطراز البري Wild-type *C. jejuni* او اصابتها بسلالة طافرة حذف فيها الجين المسؤول عن انتاج الذيفان الخلوي CDT ارتفاع في مستوى الضد النوعي IgG2a، وهذا يدل على استجابة الخلايا التائية المساعدة من النوع الأولTh-1 للقضاء على البكتريا في الفئران المصابة (Fox *et al.*, 2004).

تلعب الخلايا التائية المساعدة من النوع السابع عشر Th-17 دوراً مهماً في السيطرة على الاصابة ببكتريا *C. jejuni* في الانسجة المخاطية المعوية من خلال انتاجها للحركيات الخلوية IL-17A, IL-17F وIL-22 (Edwards *et al*., 2010). إذ يحفز IL-17 الخلايا الظهارية على انتاج (β-defensin-2) وبالتالي يؤثر في قابلية بكتريا *C. jejuni* على الغزو والبقاء داخل الخلايا المعوية، كما يحفز IL-22 وIL-17الخلايا الظهارية المعوية على انتاج الحركيات الخلوية مثل CCL20,Granulocyte colony stimulatory factor (G-CSF) وIL-8 (Ishigame *et al*., 2009). ان حث انتاج IL-8 وG-CSF يؤدي الى تجمع الخلايا العدلة وتنشيطها للقيام بعملية البلعمة (Roilides *et al*., 1991; Blaschitz and Manuela, 2010). تنتج الخلايا الشجيرية عند تعرضها لبكتريا *C. jejuni* الحركيات الخلوية IL-23, IL-1β, IL-6 و IL-12 ، وان تمايز الخلايا التائية المساعدة T-helper ($CD4^+$) إلى الخلايا المساعدة من النوع السابع عشر Th-17 يعتمد على وجود الحركيات الخلوية مثل IL-23, IL-6 و Transforming granulocyte factor-β (TGF-β) (Blaschitz and Manuela, 2010; Edwards *et al*., 2010).

ان الخلايا اللمفاوية الموجودة في الانسجة المخاطية لها دور مهم في الاستجابة المناعية عند الاصابة ببكتريا *C. jejuni* من خلال انتاجها للحركي الخلوي IFN-γ مثل الخلايا القاتلة الطبيعية NK-cells والخلايا اللمفاوية التائية الشبيه بالعفوية نوع كاما دلتا γσ T cells والخلايا اللمفاوية التائية $CD8^+$T cell (Edwards *et al*., 2010).

## ٢-١٢ إمراضية بكتريا *C. jejuni* في حيوان المختبر

ان الآليات التي تستخدمها بكتريا *C. jejuni* لإحداث الخمج في الانسان معقدة وغير معروفة بصورة كاملة (Dasti, 2007). وقد حاولت العديد من الدراسات تحديد تلك الاليات باستخدام نماذج حيوانية مختلفة فقد استخدم الجرذ (Humphrey *et al*., 1985; Aguero-Rosenfeld *et al*., 1990)، والقرود (Russell *et al*., 1993)، والنمس (Fox *et al*.,1987; Bell and Manning, 1990) ، والارنب (Caldwell *et al*., 1983; Caldwell and Walker, 1986)، وخنزير غينيا (Sultan-Dosa *et al*., 1983)، والفأر (Stanfield *et al*., 1987; Hanninen, 1989)، والكلاب (Prescott *et al*., 1981)، والدجاج (Ruiz-Palacios *et al*., 1981; Sanyal *et al*., 1984).

يعد الدجاج من النماذج الحيوانية التجريبية المفيدة إذ انه يستعمر طبيعياً ببكتريا *C. jejuni* (Konkel *et al*., 2003). كما تمثل صغار النمس نموذجاً حيوانياً ملائماً لدراسة إمراضية بكتريا *C. jejuni* إذ ادى التجريع الفموي لهذه الحيوانات الى استعمار الامعاء الذي استمر 12 يوماً مع وجود اسهال بسيط الى معتدل (Fox *et al*., 1987). واستخدم النمس البالغ لدراسة الامراضية والاستجابة المناعية لبكتريا *C. jejuni* (Nemelka *et al*., 2009). وان تجريع الخنازير ادى الى ظهور اعراض والتهابات مماثلة لتلك التي لوحظت في الانسان (Konkel *et al*., 2003). كما استخدمت الخنازير معروفة النبيت الطبيعي (Gnotobiotic pigs) لدراسة الامراضية وقد لوحظ على الخنازير المصابة حالة الاسهال المائي بعد يومين من تجريعها مع ظهور افات مرضية في الامعاء (Boosinger and Powe, 1988). ايضاً استخدمت الجراء وصغار القرود لدراسة إمراضية بكتريا *C. jejuni* (Prescott *et al*., 1981).

استخدمت الفئران كنماذج تجريبية لدراسة استعمار بكتريا *C. jejuni*، إذ تتميز هذه البكتريا بقدرتها على الارتباط مع الخلايا المعوية للفئران، وقد ادى تجريع الفئران فموياً بهذه البكتريا الى استعمار الامعاء وحدوث افات مرضية نسيجية تشابه الآفات التي تسببها هذه البكتريا في الانسان مع حدوث تجرثم الدم في بعض الحالات لكن لم تظهر حالات الاسهال على الفئران المصابة (Blaser *et a*l., 1983b; Abimiku and Borriello, 1989). في حين اشارت بعض الدراسات الى ان التجريع الفموي للفئران ببكتريا *C. jejuni* ادى الى ظهور العلامات السريرية للإصابة ومنها الاسهال (Jain *et al*., 2008; Al-Juboori,

(2010، كما ان حقن الفئران بجرع عالية داخل الغشـاء البريتوني (Intraperitonium) ادى الى ظهور العلامات السـريرية التي تشـابه علامات الاصـابة في الانسـان مثل الاسـهال وفقدان الوزن (Bar,1988). واشارت بعض الدراسات الى ان الفئران المختبرية لا تستعمر طبيعياً ببكتريا *C. jejuni* بسبب وجود البكتريا المعوية المنافسـة لها (Enterpathogenic *Helicobacter* Spp.) التي شـخصـت كمتعايشـات في الجرذ والفئران (Fox *et al*., 1997). كمـا وجـد ان اســـتخـدام الفئران المختبريـة معروفـة النبيـت الطبيعي (Gnotobiotic mice) افضـــل من اســـتخدام الفئران كاملة النبيت الطبيعي (Holoxenic mice) (Fauchere *et al*., 1985). ووجد ان الفئران المختبرية نوع (Balb/c mice) تشـكل نموذج جيد لدراسـة العلاقة الامراضـية والمناعية بين البكتريا الممرضـة *C. jejuni* والمضـيف (Pancorbo *et al*., 1993; Baqar *et al*., 1995). كما اشـارت بعض الدراسـات الى اعطاء الفئران بعض المضـادات الحيوية عن طريق الفم قبل التجريع الفموي ببكتريا *C. jejuni* لتثبيط النبيت الطبيعي المعوي ولإطالة فترة استعمار البكتريا للأمعاء (AL-Delaimi and AL-Hadithi, 2008). وقد اسـتخدمت الفئران المختبرية في تجارب مختلفة تضـمنت بكتريا *C. jejuni* بسـبب معرفة النبيت الطبيعي المعوي التي تحتويها تلك الحيوانات ولصـفاتها الوراثية الموصـوفة مسبقاً (Migaki and Capen, 1984). كما استخدمت فئران محورة جينياً لدراسـة تأثير الطراز المظهري والاستجابة المناعية للمضيف على التعبير عن المرض (Lippert *et al*., 2009). ايضـا استخدمت الفئران المختبرية لدراسة دور عوامل الضراوة مثل الاسواط في استعمار الغشاء المخاطي المعوي (Morooka and Amako, 1985; Newwell *et al*., 1985).

ان التكلفة العالية والحجم الكبير فضلاً عن صعوبة التعامل مع بعض الحيوانات جعل من الصعب استخدامها في المختبرات البحثية لذا تعد الفئران من أكثر الحيوانات المختبرية استعمالا بوصفها أنموذجاً تجريبياً للتحري عن إمراضية بكتريا *C. jejuni* وباستعمال طرق الحقن المختلفة. إذ استعملت طريقة الحقن في الوريد لدراسة انتقال البكتريا الى الاعضاء المختلفة والتداخل بين البكتريا والاليات الدفاعية في المضيف ولدراسة تأثير بعض الذيفانات (Bar *et al*., 1989; Kita *et al*., 1990). كما استخدم الحقن داخل الغشاء البريتوني لتحديد الجرعة المهلكة ودراسة التأثيرات المرضية للبكتريا (Stanfield *et al*., 1987; Pancorbo *et al*., 1993; Mixter *et al*., 2003; Dasti, 2007) .

# ٣- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 3-1 المواد Materials

### 3-1-1 الأجهزة والأدوات Equipments and tools

استخدمت الاجهزة والادوات المدرجة ادناه:

| الأجهزة والادوات | المنشأ/ الشركة المصنعة |
|---|---|
| المبلمر الحراري الحلقي Thermocycler | GeneAmp / Singapore |
| ثلاجة Refrigerator | Ishtar / Iraq |
| حاضنة Incubator | GallenKamp / England |
| حمام مائي Water bath | Memmert / Germany |
| جهاز الاليزا ELISA | Spain/ Biokit |
| جهاز الذبذبات فوق الصوتية Ultrasonic sonicator | Kodo / Korea |
| جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis cell | Labner /Taiwan |
| جهاز قياس الأُس الهيدروجيني PH-meter | Philips / Holand |
| جهاز Gel documentation | Biometra / Germany |
| فرن كهربائي Oven | GallenKamp/ England |
| مازج Vortex mixer | Griffen and George Ltd, U.K. |
| مازج مغناطيسي Magnetic stirrer | Gallen Kamp/ UK |
| مجهر ضوئي مركب Compound light microscope | Olympus / Japan |
| منبذة Centrifuge | Hermle / Germany |
| منبذة فائقة السرعة Ultra high speed centrifuge | Sigma/ Germany |
| ميزان حساس Sensitive balance | Sartorius / U. K |
| موصدة Autoclave | Webeco-GmbH/ Germany |
| مطياف ضوئي Spectrophotometer | Optima/ Japan |
| أنابيب بلاستيكية معقمة Plane tubes | AFMA- Dispo/ Jordan |
| أطباق بتري بلاستيكية Petri dishes | Sterilin /England |
| انابيب ابندروف Ependroff tubes | Grenir/ Germany |
| عدة تحرير الغاز Gas generating kit | Oxoid/ England |
| شرائح زجاجية وأغطية Slides and cover slips | Meheco / China |

| | |
|---|---|
| مرشحات غشائية دقيقة Millipore filters | Sartorius / Germany |
| ماصات باستور Pasture pipettes | Bio- Merieux / France |
| صفيحة متعددة الحفر Multiwell plate | Biohit/ Finland |

## 3-1-2 المواد الكيميائية

استخدمت المواد الكيميائية المدرجة ادناه:

| **المادة الكيميائية** | **المنشأ/ الشركة المصنعة** |
|---|---|
| اغار – اغار Agar – agar | Himedia / India |
| اغاروز Agarose | BDH / England |
| اسيتون Acetone | BDH / England |
| البومين المصل البقري Bovine serum albumin | BDH / England |
| الفا–نفثيل أمين α- naphthylamine | Sigma / USA |
| ايثانول Ethanol | Fluka / Switzerland |
| بايروفات الصوديوم Sodium pyruvate | BDH / England |
| ببتون Peptone | Himedia / India |
| بروميد الاثيديوم Ethidium bromide | Sigma / USA |
| بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate | BDH / England بيروكسيد |
| الهيدروجين Hydrogen peroxide 3 % | BDH / England |
| بيوتانول Butanol | BDH / England |
| تربتون Tryptone | Oxoid / England |
| الترس القاعدي Tris-OH | BDH / England |
| الترس الحامضي Tris-HCl | BDH / England |
| حامض الخليك Acetic acid | BDH / England |
| حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid | BDH / England |
| حامض الكبريتيك Sulfuric acid ($H_2SO_4$ 98 %) | BDH / England |
| حامض التانيك Tannic Acid | BDH / England حامض |
| الهيدروكلوريك Hydrochloric acid (HCl) | BDH / England |
| خلاصة الخميرة Yeast extract | Oxoid / England |

| | |
|---|---|
| سترات الصوديوم الثلاثية Sodium tri-citrate | BDH / England |
| سكروز Sucrose | Difco / USA |
| سيفالوثين Cephalothin | Mission pharm / India |
| سيستائين Cystiene | Difco / USA |
| صبغة رايت Wright stain | Difco / USA |
| صبغة الكوماسي الزرقاء Coomassie brilliant blue | Sigma / USA |
| صبغة الايوسين Eosin stain | Fluka/ Switzerland |
| صبغة كمزا Giemsa stain | Mast Diagnostic / USA |
| صبغة غرام Gram stain | Difco / USA |
| صبغة الهيماتوكسيلين Hematoxylin stain | Fluka / Switzerlan |
| فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين $K_2HPO_4$ | BDH / England |
| فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4 | BDH / England |
| فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na2HPO4 | BDH / England |
| فورمالين Formalin (40%) | BDH / England |
| فينول Phenol | BDH / England |
| كبريتات الحديد ferrous sulfate | Oxoid / England |
| كبريتات الصوديوم ثنائيةالاسيل Sodium dodecyl sulfate | AppliChem/Germany |
| كبريتات الامونيوم Ammonium sulfate | BDH / England |
| كحول الايزواميل Isoamyl alcohol | Mast Diagnostic /USA |
| كحول الايزوبروبانول Isopropyl alcohol | Mast Diagnostic /USA |
| كلايكول متعدد الاثيلين Polyethylene glycol | BDH / England |
| كلوريد الباريوم Barium chloride ($BaCl_2$) | BDH / England |
| كلوريد الحديد Ferrous chloride ($FeCl_2$) | BDH / England |
| كلوريد الصوديوم Sodium chloride (NaCl) | BDH / England |
| كلوريد الامونيوم $NH_4Cl$ | Difco / USA |
| كلوكوز Glucose | BDH / England |
| كليسيرول Glycerol | Sigma / USA |
| كلوروفورم Chloroform | BDH / England |

| | |
|---|---|
| محلول الاوكسيديز Oxoidase solution | Himedia / India |
| ننهايدرين Ninhydrine | Fluka / Switzerland |
| نايتروبلوتترازوليوم Nitrobluetetrazolium | BDH / England |
| نشا Starch | Difco / USA |
| يوريا Urea | BDH / England |

## 3-1-3 الأوساط الزرعية Culture media

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة(Himedia, India) المثبتة على العبوات وعدل الرقم الهيدروجيني وعقمت الأوساط بالموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /أنج$^2$ ولمدة 15 دقيقة وفقاً لما جاء في Macfaddin (2000). شملت الاوساط ما يلي:

### 3-1-3-1 أوساط العزل الأولي لبكتريا *C. jejuni*

**1- وسط اغار الكمبيلوبكتر *Campylobacter* agar**

استعمل هذا الوسط في العزل الاولي الانتقائي لبكتريا *C. jejuni* من عينات البراز. يحتوي هذا الوسط على المكونات الآتية:

- اغار الكمبيلوبكتر الاساس *Campylobacter* agar base
- دم انسان بنسبة 7% (Human blood)
- متطلبات سكيرو (Skirrow supplement III)

**1-1 تحضير متطلبات سكيرو Skirrow supplement III**

جهزت المضادات الحيوية (Antibiotics) المستعملة من شركة (Himedia) وهي معبأة في قنينة تحمل رقم الوجبة (FD008)، اذ تم إذابة المضادات الحيوية والتي تشمل2.5 ملغم من (Trimethoprim)،١,٢٥ وحدة دولية (IU) من (Polymyxin B)، و٥ ملغم من (Vancomycin) في 5 مل من الماء المقطر ومزجت جيداً ثم عقمت باستخدام وحدة المرشح الدقيق حجم ثقوبها ٠,٢٢ مايكروميتر، واستعملت مباشرة في تحضير الوسط الانتقائي.

**2-1 تحضير الوسط**

حضر الوسط بإذابة 20 غم من وسط (*Campylobacter* agar base) في 460 مل من الماء المقطر ثم عقم بالموصدة، ترك الوسط ليبرد بدرجة حرارة 45 م° ثم أضيف إليه دم بشري بنسبة 7% ورج جيداً ثم أضيف إليه محلول (Skirrow supplement III) ومزج جيداً ثم وزع الوسط في أطباق معقمة وحفظت في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال.

**٢- وسط أغار الجكليت** **Chocolate agar**

حُضّر هذا الوسط بإضافة ٧% من الدم إلى أغار نقيع القلب– الدماغ (Brain-heart infusion agar) أو أغار الدم الأساس (Blood agar base) ، ثم سخن الوسط إلى أن اصبح غامق اللون (بني غامق) ثم برد إلى ٤٥ م°. استخدم هذا الوسط في العزل الاولي لبكتريا *C. jejuni* بطريقة الترشيح، كما استخدم في إعادة الزرع في العزل الثانوي(Steele and Mcdermott, 1984).

## 3-1-3-2 أوساط التنقية والإدامة والحفظ

**١- وسط أغار الدم** **Blood agar**

حُضّر هذا الوسط من أغار نقيع القلب – الدماغ أو أغار الدم الأساس بحسب تعليمات الشركة المصنعة مضافاً إليه دماً بشرياً بنسبة ٧% ومنشطات النمو (Growth supplements) بنسبة ٠,٠٢٥% والتي تشمل بايروفات الصوديوم (Sodium pyruvate) وكبريتات الصوديوم (Sodium metabiosulfate) وكبريتات الحديد (Ferrus sulfate). استعمل هذا الوسط لتنقية المزرعة البكتيرية بوصفه أول خطوة بعد العزل الأولي (Bolton and Coats, 1983).

**2- وسط حفظ السلالات البكتيرية** **Maintenance media**

حُضّر الوسط من وسط مرق البروسيلا (Brucella broth) مضافاً إليه الكليسرول بنسبة ٢٠% (Vandepitte and Verhaegen, 2003).

## 3-1-3-3 أوساط تشخيص البكتريا **Identification media**

**1- وسط مرق البروسيلا** **Brucella broth**

استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية النمو في درجات الحرارة 25، 37 و 42 م° (Vandepitte and Verhaegen, 2003).

**٢- وسط مرق نقيع القلب – الدماغ** **Brain – eart infusion broth**

استعمل هذا الوسط لنقل العينات الى المختبر ولتنشيط البكتريا، كما استعمل في اختبار تحمل الملوحة بإضافة كلوريد الصوديوم بنسبة 1.5% مرة و3.5% مرة اخرى مع تثبيت الرقم الهيدروجيني الى 7.2 (Doyle and Roman, 1982; Sjogren *et al*., 1987).

**٣- وسط اغار الماكونكي** **Macconkey agar**

استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية العزلات البكتيرية على النمو على اغار الماكونكي (Winn *et al*., 2006).

**٤- وسط اغار ثلاثي السكر والحديد** **Triple sugar iron agar**

استعمل هذا الوسط لاختبار قابلية العزلات البكتيرية على تخمير السكريات (الكلوكوز, اللاكتوز و السكروز) وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين ($H_2S$) وثاني اوكسيد الكاربون (Forbes *et al*., 2007).

**٥- وسط اختزال النترات** **Nitrate reduction medium**

حُضّر هذا الوسط بإذابة 0.2 غم من نترات البوتاسيوم ($KNO_3$) و5 غم من الببتون في 1000 مل من الماء المقطر، ثم وزع في انابيب زجاجية وعقم بالموصدة. استعمل الوسط في الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على اختزال النترات (Macfaddin, 2000).

**٦- وسط اغار اليوريا** **Urea agar**

حُضّر ٩٥٠ مل من وسط اغار اليوريا الأساس (Urea agar base) بحسب تعليمات الشركة المصنعة، وعقم بالموصدة، وبعد التبريد إلى درجة حرارة ٤٥ م° أضيف ٥٠ مل من محلول 40% يوريا معقم بالترشيح، بعدها مزج المحلول جيدا ووزع بأنابيب معقمة وترك ليتصلب بشكل مائل، واستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم اليوريز (Katelaris *et al*., 1991).

**7- وسط اختبار تحلل الهيبيورات** **Hippurate hydrolysis test medium**

حُضّر هذا الوسط بإذابة 1 غم من مادة هيبيورات الصوديوم في 100 مل ماء مقطر، ثم عقم بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية حجم ثقوبها ٠,٢٢ مايكروميتر. وزع الوسط بحجم 0.4 مل في أنابيب اختبار معقمة، وخزن عند درجة -٢٠ م° لحين الاستعمال ولمدة لا تتجاوز الاسبوع. استخدم للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج الحامض الاميني الكلايسين (Glycin) الناتج عن تحلل أملاح هيبورات الصوديوم (Lin *et al.,* 1986).

**٨- وسط اختبار الحركة** **Motility medium**

حضر هذا الوسط من وسط مرق نقيع القلب – الدماغ في ١٠٠ مل من الماء المقطر مضافاً إليه 0.4 غم من الاغار-اغار (Agar-agar)، عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7 وعقم بالموصدة، ثم ترك الوسط ليبرد وأضيف إليه 2 مل من الدم المتحلل ووزع بحجم 5.0 مل في أنابيب اختبار معقمة. استعمل هذا الوسط لاختبار قابلية العزلات البكتيرية على الحركة (Macfaddin, 2000).

**٩- وسط اغار مولر – هنتون** **Muller – Hinton Agar**

حُضّر الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة، وبعد التعقيم والتبريد إلى درجة ٤٥ م° أضيف إليه ٧% من الدم ثم صب في اطباق معقمة، استخدم هذا الوسط في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Vandepitte and Verhaegen 2003).

**10- وسط مرق لوريا برتاني** **Luria – bartani broth (LB)**

حضر بإذابة 1 غم من التربتون (Tryptone)، 0.5 غم من خلاصة الخميرة (Yeast extract)، و1 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر، ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.5 وعقم بالموصدة. استخدم هذا الوسط لتهيئة البكتريا لاستخلاص الدنا DNA (Sambrook and Rusell, 2001).

**3-1-3-4 أوساط إنتاج الذيفان** **Toxin production media**

**1- وسط انتاج الذيفان الكبدي** **Hepatotoxin production medium**

حُضّر الوسط بإذابة ٢ غم من التربتون، 2.0 غم من فوسفات البوتاسيوم الاحادية ($K_2HPO_4$)، 6.0 غم من كلوريد الصوديوم، 1 غم من النشأ (Starch)، 0.02 غم من السيستائين (Cysteine)، 1 غم من خلاصة الخميرة، و0.1 غم من بيكاربونات الصوديوم (Sodium bicarbonate) في 100 مل ماء مقطر، ثم عقم بالموصدة (Kita *et al*. ,1986).

**٢- وسط انتاج عديد السكريد الشحمي** **LPS production medium**

حُضّر الوسط بإذابة 20 غم من الكلوكوز، 0.5 غم من ($NH_4Cl$)، 2.72 غم من فوسفات البوتاسيوم الثنائية ($KH_2PO$) و 6 مل من محلول الأملاح المعدنية في 1000 مل ماء مقطر، ثم عقم بالموصدة (Marques *et al*., 1986).

**3-1-4 الأوساط المناعية** **Immunological media**

**١- وسط اغار-اغار** **Agar-agar**

حُضّر بحسب تعليمات الشركة. استعمل في دراسة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض Leucocytes migration Inhibition Factor (LIF) (Soberg, 1969) .

**٢- وسط الايكل الأساس** **Basal eagle medium**

حُضّر هذا الوسط بإذابة 1 غم من المادة الأساس في 100 مل من الماء المقطر. ثم عقم باستخدام وحدة المرشح الدقيق بقطر ثقوب ٠,٢٢ مايكروميتر. استعمل في دراسة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض LIF (Soberg, 1969).

## 3-1-5 الصبغات والكواشف

**1- صبغة غرام** **Gram stain**

استخدمت عدة تصبيغ غرام الجاهزة الصنع. وهي حاوية على الكاربول فوكسين بدلاً من السفرانين.

**2- صبغة الايوسين والهيماتوكسلين** **Hematoxylin and Eosin stain (H&E)**

حُضّرت بإذابة 1 غم من الصبغة في 99 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 75%. استعملت في تحضير المقاطع النسيجية (Humson, 1972).

**3- صبغة نايتروبلوتترازوليوم** **Nitro blue tetrazolium (NBT)**

حُضّرت هذة الصبغة انياً قبل الاستعمال بإذابة 0.1 غم من مسحوق صبغة (NBT) في 100 مل من دارئ الفوسفات الملحي ووضعت في علبة معقمة ومعتمة. استخدمت هذا الصبغة في فحص النشاط البلعمي (Metcalf *et al*., 1986).

**4- صبغة رايت** **Wright stain**

استخدمت الصبغة الجاهزة الصنع في صبغ الشرائح الزجاجية في فحص النشاط البلعمي (Metcalf *et al*., 1986).

**5- كاشف الكاتليز** **Catalase reagent**

حُضّر بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) بنسبة 3%. استعمل للتحري عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتليز المحلل لبيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) (Macfaddin,2000).

**6- كاشف الاوكسديز** **Oxidase reagent**

استخدم محلول الاوكسديز الجاهز الصنع. استعمل للتحري عن قدرة العزلات البكتيرية على انتاج انزيم الاوكسديز (Macfaddin, 2000).

**7- كاشف النهايدرين** **Ninhydrin reagent**

حُضّر الكاشف بإذابة 3.5 غم من مادة النهايدرين في 100 مل من مزيج متكون من الأسيتون (Aceton) و البيوتانول (Butanol) بنسبة 1:1. استعمل في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الحامض الاميني الكلايسين الناتج عن تحلل أملاح هيبيورات الصوديوم (Winn *et al*, 2006).

**8- كاشف اختزال النترات** **Nitrate reduction reagent**

حضر هذا الكاشف بخلط حجمين متساويين من المحلول (1) والمحلول (2) وكالاتي:

– **المحلول (1):** حضـر بإذابة ٥ غم من مادة (α-naphthyl amine) في 1000 مل من حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) (5N).

– **المحلول (2):** حضر بإذابة 8 غم من حامض السيلفونك (Sulfonic acid) في 1000 مل من حامض الخليك الثلجي (5N) , اســتعمل هذا الكاشــف للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية على اختزال النترات إلى نتريت (Macfaddin, 2000).

## 3-1-6 المحاليل والدوارئ Buffers and solutions

عقمت المحاليل بالموصدة بدرجة حرارة 121 مº وضغط 15 باوند /أنج$^2$ ولمدة 15 دقيقة. اما المحاليل التي تتلف بالحرارة فقد عقمت بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتر.

### 3-1-6-1 المحاليل المستخدمة في عزل بكتريا *C. jejuni*

**1- محلول دارئ الفوسفات Phosphate buffered solution**

حُضّر بإذابة 9 غم من كلوريد الصوديوم، 0.34 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ($KH_2PO_4$)، 1.21 غم من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ($K_2HPO_4$) في 1000 مل من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2، ثم عقم بالموصدة. استعمل لتعليق البكتريا (Collins *et al.*, 2004).

**٢- محلول مكفرلاند Macfarland solution**

حُضّر هذا المحلول بحسب ما ورد في Finegold وجماعته (1978) وكالآتي:

1- محلول أ: حضر بإذابة 1.175 غم من مسحوق كلوريد الباريوم ($BaCl_2$) في 90 مل من الماء المقطر المعقم، ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

2- محلول ب: حضر بمزج 1 مل من حامض الكبريتيك المركز ($H_2SO_4$) مع 99 مل من الماء المقطر المعقم.

حضرت منه تراكيز مختلفة لضبط تراكيز العوالق البكتيرية.

**3- المحلول الملحي الفورمالينـي 10% Formal saline solution**

حُضّر بمزج 10 مل من الفورمالين التجاري 40% مع 90 مل من المحلول الملحي المعقم. استخدم هذا المحلول لخزن وحفظ العينات النسيجية (Stukus, 1997) .

### 3-1-6-2 المحاليل المستخدمة في تقنية التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا PCR

### 3-1-6-2-1 المحاليل المستخدمة في استخلاص الدنا DNA

حُضّرت هذه المحاليل بحسب الطريقة الموصوفة من Pospiech and Neumann (1995) كما يلي:

**1- دارئ Tris EDTA (TE)**

حُضّر بإذابة 0.05 مولار من مادة الترس القاعدي (Tris-OH) و 0.001 مولار من (EDTA) في 800 مل من الماء المقطر، ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وعقم بالموصدة وحفظ بدرجة حرارة 4 مº لحين الاستعمال.

**2- محلول SDS (25%)**

حُضّر هذا المحلول انياً قبل الاستعمال بإذابة 25 غم من كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل (SDS) في 100 مل من الماء المقطر، ثم عقم بالموصدة.

**3- محلول كلوريد الصوديوم (5 مولار)**

حُضّر هذا المحلول بإذابة 14.625 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر وعقم بالموصدة ثم حفظ بدرجة حرارة 4 مº لحين الاستعمال.

**4- محلول مزيج الفينول – الكلورفورم – الكحول الايزواميلي**

حُضّر هذا المحلول بمزج الفينول – الكلورفورم – الكحول الايزواميلي بنسبة (1:24:25) وحفظ في عبوة زجاجية معتمة وبدرجة حرارة 4 مº.

### 3-1-6-2-2 المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي

حُضّرت محاليل الترحيل الكهربائي بحسب طريقة Sambrook and Rusell (2001) وكالاتي:

**1- دارئ TBE (Tris-borate-EDTA)**

حُضّر من اذابة 0.089 مولار من مادة الترس القاعدي (Tris-OH) ، 0.089 مولار من حامض البوريك (Boric acid) و 0.002 مولار من (EDTA) في 800 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وعقم بالموصدة ثم حفظ بدرجة حرارة 4 مº لحين الاستعمال.

**2- محلول بروميد الاثيديوم Ethidium bromide solution** حُضّر محلول خزين بتركيز 5 ملغم/مل بإذابة 0.05 غم من مسحوق بروميد الاثيديوم في 10 مل من الماء المقطر المعقم، مزج المحلول جيداً وحفظ في قنينة معقمة معتمة.

**3- دارئ التحميل Loading buffer**

استعمل دارئ تحميل الدنا الجاهز الصنع شركة (Promega, USA).

### 3-1-6-3 المحاليل المستخدمة في استخلاص الذيفان الكبدي

حُضّرت هذه المحاليل بحسب الطريقة المذكورة من Kita وجماعته (1990) كما يلي:

**1- دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCl (0.01 مولار)**

حُضّر بإذابة 1.5706 غم من مادة (Tris-HCl) في 900 مل من الماء المقطر، ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وعقم بالموصدة.

**2- دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك الحاوي $MgCl_2$ (0.01 مولار) ، SDS (0.05%)**

حُضّر بإذابة 0.951 غم من كلوريد المغنسيوم ($MgCl_2$) و 0.05 غم من (SDS) في 100 مل من دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك المحضر وفقاً للفقرة السابقة، ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وعقم بالموصدة.

**3- دارئ الفوسفات الملحي (0.01 مولار)**

حُضّر بمزج 51 مل من 0.01 مولار فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين ($NaH_2PO_4$) (حضر بإذابة 39.1 غم من ($NaH_2PO_4$) في لتر من الماء المقطر ) مع 49 مل من محلول 0.01 مولار فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين ($Na_2HPO_4$) (حضر بإذابة 1.77 غم من $Na_2HPO_4$ في لتر من الماء المقطر) ثم أكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر. وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ثم عقم بالموصدة.

### 3-1-6-4 المحاليل المستخدمة في وسط انتاج عديد السكريد الشحمي

**1- محلول الاملاح المعدنية**

حُضّر هذا المحلول بإذابة 0.1 غم من ($CaCl_2$) و 0.4 غم من ($FeSO_4.7H_2O$) و 0.075 غم من ($MnSO_4.7H_2O$) في كمية قليلة من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم النهائي الى لتر ( Marques *et al.*, 1986).

### 3-1-6-5 المحاليل المستخدمة في تقدير كمية البروتين

حُضّرت هذه المحاليل بحسب طريقة Bradford (١٩٧٦) كما يلي:

1- محلول صبغة الكاشف:

حضر محلول صبغة الكاشف بإذابة 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء جي-250 ( Coomossie brilliant blue G -250) في 50 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 95% مع التحريك

المستمر ثم أضيف 50 مل من حامض الفسفوريك تدريجيا بتركيز 85% وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر البارد، رشح محلول صبغة الكاشف باستخدام ورق الترشيح (Whatman No.1) وحفظ بقنينة معتمة بدرجة حرارة 4 مº لحين الاستعمال.

٢- محلول ألبومين المصل البقري الخزين (Bovine serum albumin) بتركيز ٢ ملغم/مل:

حُضّر بإذابة 0.2 غم من ألبومين المصل البقري بكمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

### 3-1-6-6 المحاليل المستخدمة في تقدير كمية الكاربوهيدرات

حُضّرت هذه المحاليل بحسب طريقة Dubois وجماعته (١٩٥٦) كما يلي:

- **محلول (١)** ١٠٠ مايكروغرام كلوكوز/ مل:

حُضّر بإذابة ٠,٠١ غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل بإضافة الماء المقطر، وحضرت منه التراكيز المطلوبة.

- **محلول (٢)** ٥ % فينول:

حُضّر بإذابة ٥ غم من الفينول البلوري في كمية من الماء المقطر، ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل بإضافة الماء المقطر.

- محلول (٣) حامض الكبريتيك المركز ٩٨%.

### 3-1-6-7 المحاليل المناعية

**1- المحلول الملحي الطبيعي Normal saline solution**

حُضّر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر. استخدم هذا المحلول في تحضير المحلول الملحي الفورمالييني وفي اختبارات التلازن (Garvey *et al.*, 1977).

**٢- المحلول الملحي الفورمالييني ٠,٥% Formal saline solution**

حُضّر بمزج 0.5 مل من الفورمالين التجاري 40% مع 99.5 مل من المحلول الملحي المعقم ليصبح التركيز النهائي للفورمالين 0.5%. استعمل في تحضير مستضدات البكتريا السالبة لصبغة كرام ومذيب للأضداد الافرازية (Kwapinski, 1972).

**3- دارئ الترس القاعدي Tris-OH buffer**

حُضّر بإذابة 12 غم من مادة الترس القاعدي في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر، وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7. استخدم هذ المحلول في تحضير محلول الكلايكول متعدد الاثيلين (Johnstone and Thorpe, 1982).

**4- محلول الكلايكول متعدد الاثيلين Polyethylene glycol solution (PEG)**

حُضّر هذا المحلول بتركيز 6% بإذابة 6 غم من الكلايكول متعدد الاثيلين في كمية قليلة من دارئ الترس القاعدي ثم اكمل الحجم الى 100 مل بنفس المحلول وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.4. استخدم هذا المحلول في فصل الاضداد الافرازية من الاثني عشر (Johnstone and Thorpe, 1982).

**5- محلول السيفر Alsever solution**

حُضّر بإذابة 24.6 غم من الكلوكوز، 9.6 غم من سترات الصوديوم الثلاثية، و5.04 غم من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر، ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 6.1، ورشح المحلول بمرشح غشائي حجم ثقوبه 0.22 مايكروميتر. استعمل هذا المحلول في تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف (Garvey *et al.*, 1977; Lewis *et al.*, 2001).

**6- محلول دارئ هيبس الملحي Hepes- buffered salt solution(Hepes-BSS)**

حُضّر هذا المحلول بإضافة ٥ مل من ($MgSO_4.7H_2O$) ( ٤١,٣ غم/لتر)،١٥ مل من ($CaCl_2$) (١٢,٤٥ غم /لتر)، ٢ مل من (KCl) (١٢,٥ غم /لتر)، ٦٠٥ مل من (NaCl) (٩,٨٣ غم /لتر)، ٣٠ مل من دارئ هيبس Hepes buffer (والمحضر بإذابة ٨٠ غم من الهيبس و ١٣,٤ غم من NaOH في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧,٢) و ١٠ مل من محلول دارئ الفوسفات. استخدم هذا المحلول كدارئ في فحص التشكل الزهري E-rosette (Myers, 1995).

**٧- محلول الدكستران (٦%) Dextran solution**

حُضّر بإذابة ٦ غم من الدكستران في ١٠٠ مل من المحلول الملحي المعقم. استخدم في عزل الخلايا متعددة الانوية (Skoog and Beck, 1956).

**٨- محلول حامض التانيك Tannic acid solution**

حُضّر بإذابة 0.005 غم من مسحوق حامض التانيك في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر. استعمل هذا المحلول في ازالة المستضدات الموجودة على سطح كريات الدم الحمر للأغنام (Garvey *et al.* , 1977).

**٩- محلول عزل الخلايا اللمفاوية Ficol-paque solution (Lympho prep solution 1.084 )**

استعمل المحلول الجاهز الصنع شركة (Himedia)، استخدم في فصل الخلايا اللمفاوية.

**١٠- كريات الدم الحمر للخراف Sheep red blood cells**

سحب الدم من الوريد العنقي للخروف ووضع في أنابيب بلاستيكية معقمة حاوية على محلول السيفر بنسبة 1:1، حفظ المزيج في درجة حرارة 4 مº، اذ يكون صالح للاستعمال مدة اسبوع واحد فقط (Garvey *et al.*, 1977).

## 3-1-7 الحيوانات المختبرية Laboratory animals

استعملت اناث الفئران السويسرية البيضاء (Swiss mice) نوع (*Mus musculus*) Balb/c mice بعمر ٨- ١٠ اسبوع تراوحت أوزانها بين 20 – 25 غرام وبعدد 87 فأرة والتي تم الحصول عليها من معهد ابحاث الاجنة في محافظة بغداد. استخدمت في اختبار فعالية الذيفان الكبدي والدراسة الامراضية. كما استخدمت ذكور الارانب المحلية (*Oryctologus cuniculus*) بعمر ٦ – 8 شهر وبوزن 1.5- 2 كيلوغراماً وبعدد ١٥ ارنباً في الدراسة المناعية. وضعت الحيوانات في أقفاص داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة ماء الشرب والعلف وتعقيم الأقفاص بين الحين والآخر. وأجري عليها قبل التجربة بعض الاختبارات للتأكد من عدم وجود أي اصابة تجعل الحيوان خارج التجربة.

## 3-2 طرائق العمل Methods

### 3-2-1 جمع العينات

جمعت ٣٤٠ عينة براز من اطفال مصابين بالإسهال تراوحت اعمارهم بين ١-٥ سنوات من مستشفى بابل للولادة والاطفال ومستشفى القاسم العام في محافظة بابل للمدة من تموز ٢٠١٠ – كانون الثاني ٢٠١١. أخذ جزء من عينة البراز بوساطة مسحة قطنية معقمة ووضعت في انابيب حاوية على الوسط الناقل مرق نقيع القلب والدماغ. نقلت العينات الى المختبر خلال مدة لا تتجاوز 3-6 ساعة (Sjogren *et al.*, 1987).

### 3-2-2 التشخيص المختبري

#### 3-2-2-1 الفحص العياني للبراز

تم ملاحظة اللون والقوام لكل عينة لتمييزها فيما اذا كان نوع البراز دموياً او مائياً.

#### 3-2-2-2 التصبيغ المباشر Direct staining

حُضّرت مسحة خفيفة من عينة البراز وصبغت مباشرة بصبغة الكاربول فوكسين (Carbol fuchsin) ١ % لمدة دقيقة واحدة. ثم فحصت تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية بسرعة تكبير 1000x للتحري عن وجود عصيات بكتريا *Campylobater* (Cheesbrough, 1991).

#### 3-2-2-3 زرع العينات

1- تم تلقيح الوسط الانتقائي (*Campylobacte*r agar) بوساطة المسحة القطنية من الوسط الناقل للعينة، ثم وضعت الأطباق في وعاء لا هوائي (Anaerobic jar) وفرت فيه الظروف الغازية اليفة الهواء القليل (Microaerophilic condition) الخاصة ببكتيريا *C. jejuni* اما باستعمال عدة تحرير الغاز (Gas generating kit) او استعمال شمعة (Candle jar) ثم حضنت بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48-96 ساعة.

2- استخدمت طريقة اخرى لعزل بكتريا *C. jejuni* من البراز، وذلك بعمل عالق من عينة البراز مع المحلول الملحي الطبيعي، ثم وضعت قطرات من هذا العالق بوساطة محقنة طبية على وسط اغار الجكليت او وسط اغار الدم الحاوي سطحه على ورقة ترشيح قطر ثقوبها 0.45 مايكروميتر. ثم وضع الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مº لمدة 30 دقيقة، بعدها ازيلت ورقة الترشيح ووضعت الأطباق في وعاء لا هوائي وفرت فيه الظروف الغازية اليفة الهواء القليل، ثم حضنت بدرجة حرارة 42 مº لمدة اسبوع (Steele and Mcdermott, 1984).

تم تنقية المستعمرات البكتيرية النامية على وسط (*Campylobacte*r agar) او وسط اغار الجكليت او اغار الدم والمشكوك بها على انها بكتريا *Campylobacte*r على وسط اغار الدم الحاوي على منشطات النمو، كما اجريت طريقة الزرع الثانوي للبكتريا على وسط اغار الدم أو اغار الجكليت، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٤٢ مº في ظروف اليفة الهواء القليل لمدة 24-48 ساعة.

### 3-2-2-4 الخصائص المظهرية Morphological characteristic

شخصت مستعمرات هذه البكتيريا مظهرياً من خلال دراسة الخصائص المزرعية للمستعمرات النامية بملاحظة شكل المستعمرات ولونها وحجمها، فضلاً عن دراسة الخصائص المجهرية للمستعمرات من خلال عمل صبغة غرام من الأوساط الزرعية.

### 3-2-2-5 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

**1- اختبار الاوكسيديز Oxidase test**

وضعت قطرة من كاشف الاوكسيديز على ورقة ترشيح ثم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة أعواد خشبية نظيفة الى الورقة. ان تلون المستعمرة المنقولة باللون البنفسجي خلال 10 ثانية دليل على ايجابية الاختبار (Macfaddin, 2000).

**٢- اختبار الكاتليز Catalase test**

وضعت قطرة من بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) تركيزه 3% على شريحة زجاجية ثم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة اعواد خشبية نظيفة ومزج مع القطرة. ان تكون الفقاعات خلال 30 ثانية دلالة على ايجابية الاختبار (Macfaddin, 2000).

**3- اختبار اليوريز Urease test**

لقح وسط مائل اغار اليوريا بطريق الطعن بمستعمرات فتية من العزلات البكتيرية، وحضنت بدرجة حرارة 42 مº ولمدة 48 ساعة في ظروف اليفة الهواء القليل. أن تغير اللون من الاصفر الى الوردي يعبر عن النتيجة الموجبة (Forbes *et al*., 2007).

**4- اختبار تحلل الهيبيورات Hippurate hydrolysis test**

لقحت انابيب وسط اختبار تحلل الهيبيورات بمستعمرات فتية من العزلات البكتيرية، وحضنت في ظروف هوائية بدرجة ٣٧ مº لمدة ساعتين. ثم اضيف ٠,٢ مل من كاشف النهايدرين لكل انبوبة واعيد حضنها بنفس الظروف لمدة ١٠ دقائق، وأن ظهور اللون البنفسجي الغامق يدل على النتيجة الموجبة (Winn *et al*., 2006).

**٥- اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز وكبريتيد الهيدروجين**

أجري هذا الاختبار بتلقيح وسط اغار ثلاثي السكر والحديد بمستعمرات فتية من العزلات البكتيرية المراد فحصها بطريقة الطعن والتخطيط. حضنت الانابيب بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة. ان تغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر دليل على ان العزلة مخمرة لكل من سكر الكلوكوز واللاكتوز، وظهور الراسب الأسود في قعر الأنبوبة دليل على قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين ($H_2S$)، وظهور الفقاعات الغازية دليل على انتاج غاز ثاني اوكسيد الكاربون (Forbes *et al*., 2007).

**6- اختبار النمو في درجات الحرارة 25، 37 و 42 مº**

لقحت ثلاثة أنابيب حاوية على وسط مرق البروسيلا بالعزلات البكتيرية المراد فحصها. حضن الأنبوب الأول في درجة حرارة ٢٥ مº, والأنبوب الثاني في درجة ٣٧ مº، والأنبوب الثالث في درجة ٤٢ مº. قرأت النتيجة بعد مرور ٢٤ – ٤٨ ساعة(Vandepitte and Verhaegen, 2003) .

**7- اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test**

لقحت انابيب اختزال النترات بالعزلات البكتيرية وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة 42مº، بعدها اضيف الكاشف المتكون من حجمين متساويين من حامض السلفونك وكاشف الفانفثيل امين، إن ظهور اللون الأحمر يعد نتيجة موجبة (Forbes *et al*., 2007).

**٨- اختبار تحمل الملوحة Salt tolerant test**

لقُحّ انبوبان حاويان على وسط مرق نقيع القلب والدماغ احدهما حاوي كلوريد الصوديوم بتركيز ١,٥% والاخر تركيز ٣,٥% بالعزلات البكتيرية، حضنت الانابيب بدرجة حرارة ٤٢ مº لمدة 48 ساعة. ان ظهور العكورة يدل على ايجابية الاختبار (Doyle and Roman, 1982).

**٩- النمو على اغار الماكونكي Growth on Macconkey agar**

لقح وسط اغار االماكونكي بطريق التخطيط، ثم حضن بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة. ان ظهور النمو دلالة على ايجابية الاختبار (Winn *et al*., 2006).

**10- اختبار الحركة Motility test**

لقح وسط الحركة شبه الصلب Semi solid medium بمستعمرات فتية من العزلات البكتيرية بطريقة الطعن، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة في ظروف غازية اليفة الهواء القليل. تكون النتيجة ايجابية بملاحظة انتشار نمو البكتيريا خارجاً من خط الطعن. كما تم وضع قطرة من العالق البكتيري على غطاء شريحة زجاجية Cover-slip بوساطة الناقل ثم وضعت على الجزء المقعر لشريحة زجاجية معدة لهذا الغرض، ثم فحصت تحت المجهر الضوئي بسرعة تكبير 1000X باستعمال العدسة الزيتية ولوحظت حركة البكتريا السريعة في مجال المجهر (Macfaddin, 2000).

**١١- اختبار الحساسية للمضادين الحيويين حامض النالدكسك Naldixic acidوالسيفالوثين Cephalothin**

اختبرت حساسية بكتريا *C. jejuni* للمضادات الحيوية على النحو الاتي: زرع 10 مل من مرق البروسيلا بعدة مستعمرات من بكتريا *C. jejuni* المنماة على وسط أغار الدم بعمر 24 ساعة ثم حضنت في ظروف غازية اليفة الهواء القليل بدرجة حرارة 42 مº لمدة 24 ساعة، بعدها تم مقارنة العكورة المتكونة مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية رقم 0.5 وباستخدام المحلول الملحي الطبيعي تم تعديل كثافة الأنابيب حتى تساوي كثافة أنبوبة مكفرلاند، بعدها وباستخدام مسحة قطنية معقمة نشرت على سطح وسط أغار مولر هنتون الصلب وبعدة اتجاهات للحصول على نمو متجانس، ترك الطبق مدة 5 دقائق ثم وضعت اقراص المضادين الحيويين حامض النالدكسك (Naldixic acid) والسيفالوثين (Cephalothin) باستعمال ملقط معقم، حضنت الاطباق في ظروف اليفة الهواء القليل بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة (Vandepitte and Verhaegen, 2003).

**3-2-2-6 التشخيص المصلي لبكتريا *C. jejuni* باستخدام Hi *Campylobacter* Latex test kit**

شخصت العزلات البكتيرية مصلياً باستخدام اختبار تلازن اللاتكس (Latex agglutination test) مع المصل الضدي الخاص ببكتريا *C. jejuni* المجهز من شركة (Himedia)، وذلك بمزج قطرة من العالق

البكتيري المراد اختباره مع قطرة من المصل الضدي الخاص ببكتريا *C. jejuni* على شريحة زجاجية نظيفة مع مراعاة اجراء اختبار السيطرة بمزج قطرة من المحلول الملحي الطبيعي مع قطرة من محلول السيطرة. تقرأ النتيجة بظهور التلازن خلال 1–2 دقيقة (Miller and Lastovica, 2008).

## 3–2–3 التحري الجزيئي عن الذيفان الكبدي في عزلات بكتريا *C. jejuni*

## Molecular detection of hepatotoxin in *C. jejuni* isolates

### 3–2–3–1 استخلاص الدنا DNA extraction

استخدمت طريقة التمليح الخارجي (Salting out) الموصوفة من Pospiech and Neumann (1995) لاستخلاص الدنا والمحورة من Hadi (2008) كما يلي:

- لقح 50 مل من وسط مرق لوريا برتاني بمستعمرات نقية للبكتريا ثم حضن بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة.
- جمعت الخلايا البكتيرية من الوسط السائل بنبذه مركزياً بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
- اهمل الرائق وعلق الراسب في 5 مل من دارئ (TE) المحضر في الفقرة (3–1–6–2–1)، ثم نبذ بسرعة 4500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، كررت هذه الخطوة مرتين.
- اهمل الرائق وعلق الراسب في 5 مل من دارئ (TE).
- اضيف 600 مايكروليتر حجم من محلول (SDS) 25% المحضر في الفقرة (3–1–6–2–1)، ثم مزجت محتويات الانبوبة بقلبها عدة مرات ووضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 55 مº لمدة 5 دقائق.
- اضيف 2 مل من محلول 5 مولار (Nacl) المحضر في الفقرة (3–1–6–2–1)، ثم مزجت محتويات الانبوبة بقلبها عدة مرات ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مº لمدة 5 دقائق.
- اضيف 5 مل من محلول الفينول–الكلوروفورم–الكحول الايزواميلي المحضر في الفقرة (3–1–6–2–1)، ثم مزجت محتويات الانبوبة بقلبها عدة مرات لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 25 مº.
- نبذ الخليط بسرعة 4500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
- نقل الطور الرائق الى انبوبة اختبار جديدة ومعقمة، ثم اضيف اليه 0.6 حجم من كحول الايزوبروبانول، ثم قلبت الانبوبة بهدوء عدة مرات وبعد 3 دقائق ظهرت خيوط الدنا.
- جمعت خيوط الدنا ووضعت في انبوبة ابندروف نظيفة ومعقمة، ثم غسلت بـــ 1 مل من 70% كحول اثيلي وتركت الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لكي تجف.
- أذيب الدنا في 200 مايكروليتر من دارئ (TE) وحفظ بدرجة حرارة –20 مº لحين الاستخدام.

### 3–2–3–2 خليط تفاعل البلمرة Master mix

استخدم (KAPA Taq Ready Mix DNA Polymerase) المجهز من شركة (KAPA, USA) والذي يتكون من:

- انزيم البلمرة KAPA Taq DNA Polymerase
- دارئ التفاعل Reaction buffer with $MgCl_2$
- deoxyNucleotidesTriphosphates ($dNTP_s$) والتي تتضمن 0.4 ملي مول لكل من (dTTP, dCTP, dGTP, dATP).

### 3-2-3-3 طريقة عمل التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الدنا PCR amplification

استعمل الدنا البكتيري المستخلص من العزلات البكتيرية كـــ (Template) في تقنية PCR للتحري عن جين *ht*B المسؤول عن الذيفان الكبدي في بكتيريا *C. jejuni*. وقد استعمل البادئ النوعي المبين تتابعه في الجدول (3-1) في تحديد التسلسل الخاص بالجين *ht*B والذي جهز من شركة (BioCorp/Canada). استخدمت تقنية PCR لتضخيم القطعة الجينية *ht*B باستخدام البادئ المذكور.

أجريت طريقة العمل بحجم 50 مايكروليتر وكما موضح في الجدول (3-2) اعتماداً على النشرة المرفقة مع الـ Master Mix.

**جدول (3-2) إحجام المواد الكيمياوية المستعملة في التفاعل**

| المواد الكيميائية | الحجم |
|---|---|
| KAPA Taq Ready Mix DNA Polymerase | 25 µl |
| Forward Primer | 2 µl of 10 pmol/µl |
| Reverse Primer | 2 µl of 10 pmol/µl |
| DNA | 5 µl |
| Nuclease-free water | اكمل الحجم الى 50 µl |
| Total | 50 µl |

بعد اتمام الاضـــافات جميعها مزجت العينات ونقلت انابيب PCR إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي (Thermal cycler) وضبط برنامج عمل الجهاز كما في الجدول التالي:

**جدول (3-3) ظروف التفاعل المستخدمة في تقنية PCR**

| رقم الخطوة | الخطوات | درجة الحرارة (مº) | الزمن (دقيقة) | عدد الدورات |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Initial denaturaion | 94 | 5 | |
| 2 | Denaturation | 94 | 0.5 | 35 |
| 3 | Annealing | 42 | 1 | |
| 4 | Extension | 72 | 0.5 | |
| 5 | Final extension | 72 | 3 | |

### 3-2-3-4 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

اتبعت طريقة Sambrook and Rusell (2001) للترحيل الكهربائي لفحص الدنا لعرض نتائج الـ PCR وكما يلي:

- حُضّر هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وذلك بإذابة 1.5غم من مسحوق الاكاروز في 100 مل من دارئ (TBE). سخن لحد الغليان ثم ترك ليبرد لدرجة حرارة 50 مº ثم أضيف إليه 2 مايكروليتر من محلول صبغة بروميد الاثيديوم ومزج جيداً.
- تم تهيئة قالب صب الهلام (Tray) وذلك بإحاطة حافتيه المفتوحتين بواسطة شريط لاصق عريض مع تثبيت المشط (Comb) قرب أحد نهايتيه وعلى بعد 1 سم من طرف القالب وذلك لغرض تكوين الحفر (Wells).افرغ الهلام في قالب الصب بهدوء لمنع تكون فقاعات هوائية في القالب مع مراعاة وضع القالب على سطح مستوي لضمان تجانس سمك الهلام ثم ترك لكي يتصلب.
- رفع المشط بعناية بعد التأكد من تصلب الهلام، ورفع الشريط اللاصق من جوانب قالب الصب.
- حُضّـر نموذج الدنا المراد تحميله وذلك بمزج 5 مايكروليتر من نموذج الدنا مع 1 مايكروليتر من دارئ التحميل ونقل إلى أحد حفر الهلام.

- نقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الذي سبق وان ملئ بدارئ TBE(1X) باذ يغمر سطح الهلام كلياً ويرتفع عنه بسمك قدره 3 ملم.
- شغل جهاز الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 70 فولت لمدة ساعة ونصف.
- فحصت نتائج الترحيل باستخدام جهاز (Gel Documentation). وتم قياس حزم الدنا بمقارنتها مع (DNA Ladder)، ثم صورت باستخدام برنامج حفظ الصور في (Gel Documentation). إن ظهور حزمة حجمها 530 زوج قاعدي قريبة من الزوج القاعدي 500 للـــ (DNA Ladder) يدل على النتيجة الموجبة.

## 3-2-4 تحضير الذيفان الكبدي Preparation of hepatotoxin

### 3-2-4-1 انتاج الذيفان الكبدي

نميت العزلة البكتيرية رقم (3) الحاوية على جين *ht*B على وسط اغار الدم، اذ تم زراعة 50 طبقاً، حضنت الاطباق في ظروف غازية اليفة الهواء القليل وبدرجة حرارة ٤٢ مº لليوم التالي. فحصت المستعمرات وعملت مسحة على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة الكاربول فوكسين للتأكد من نقاوة المستعمرات. جمعت الخلايا بعملية القشط باستخدام الناشر (Spreader) ونقلت الى وسط انتاج الذيفان الكبدي المحضر في الفقرة (3-1-3-4-1) بواقع 5 اطباق لكل 100 مل وحضنت الدوارق في ظروف غازية اليفة الهواء القليل بدرجة حرارة 42 مº لمدة 48 ساعة.

### 3-2-4-2 استخلاص الذيفان الكبدي الخام Extraction of crude hepatotoxin

تم استخلاص الذيفان الكبدي وفقاً لطريقة Kita وجماعته (1990) مع اجراء بعض التحويرات وعلى النحو الاتي:

بعد الحضن نبذ المزروع البكتيري بالمنبذة المبردة بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 مº. غسلت الخلايا المترسبة باستعمال دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك (0.01 مولار) المحضر وفق الفقرة (3-1-6-3-1) مرتين. علق الراسب الذي تم جمعه في ٢٠ مل من دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك الحاوي 0.01 مولار ($MgCl_2$) ، 0.05% (SDS) المحضر في الفقرة (3-1-6-3-2). بعدها عومل العالق بجهاز الذبذبات فوق الصوتية (Ultrasonic sonicator) لمدة 20 دقيقة بتردد قدره 50 ذبذبة في الثانية، ثم نبذ العالق بسرعة 7500 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة، اهمل الراسب ونبذ الراشح بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 60 دقيقة، بعدها اهمل الراسب ونبذ الراشح بسرعة 18000 دورة/دقيقة لمدة 60 دقيقة، بعدها نبذ بسرعة 18000دورة/دقيقة لمدة 240 دقيقة عندها جمع الراسب وغسل باستعمال الماء المقطر مرتين. ثم جرت ديلزته حيال عدة تبديلات باستخدام الماء المقطر بدرجة حرارة 4 مº لمدة 48 ساعة. بعدها

نبذ باستعمال المنبذة المبردة وعلى سرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4 مº. جمع الراسب وعلق في 10 مل من دارئ الفوسفات الملحي (0.01 مولار) المحضر وفق الفقرة (3-1-6-3-3).

### 3-2-4-3 ترسيب الذيفان الكبدي بكبريتات الامونيوم

أضيفت بلورات كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة الى المستخلص الخام للذيفان الكبدي بشكل تدريجي مع التحريك المستمر باستخدام المازج المغناطيسي لمدة 60 دقيقة في حمام ثلجي وبنسبة اشباع 30% و 65%. ثم نبذ المحلول بسرعة 18000دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 مº. جمع الراسب المتكون بعد عملية النبذ في قنينة معقمة بعد إذابته بأقل كمية ممكنة من دارئ الفوسفات الملحي (0.01 مولار). ثم جرت ديلزته حيال عدة تبديلات باستخدام الماء المقطر بدرجة حرارة 4 مº لمدة 72 ساعة (Kita *et al.*, 1990). ثم قدر تركيز البروتين والكاربوهيدرات في مستخلص الذيفان الكبدي.

## 3-2-5 تحضير عديد السكريد الشحمي

## Preparation of lipopolysaccharide

### 3-2-5-1 استخلاص عديد السكريد الشحمي

### Extraction of lipopolysaccharide

نميت العزلة البكتيرية رقم (3) على وسط اغار الدم، اذ تم زراعة 50 طبقاً. حضنت الاطباق في ظروف غازية اليفة الهواء القليل بدرجة حرارة ٤٢ مº لليوم التالي ثم فحصت المستعمرات وعملت مسحة على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة الكاربول فوكسين للتأكد من نقاوة المستعمرات. جمعت الخلايا بعملية القشط باستخدام الناشر ونقلت الى وسط انتاج عديد السكريد الشحمي المحض في الفقرة (3-1-3-4-2) بواقع 5 اطباق لكل 100 مل، ثم حضنت الدوارق في ظروف غازية اليفة الهواء القليل بدرجة حرارة 42 مº لمدة 72 ساعة.

اتبعت طريقة Learen وجماعته (1987) المحورة من Nuaman (2002) لاستخلاص عديد السكريد الشحمي وكما يأتي:

- اضيفت مادة (EDTA) الى وسط الانتاج بتركيز 2 ملي مولار، ثم وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 37مº ولمدة 30 دقيقة.
- عوملت الخلايا بجهاز الذبذبات فوق الصوتية لمدة 30 ثانية بتردد قدره 20 ذبذبة في الثانية لتكسير الخلايا مع مراعاة استخدام الثلج المجروش.
- رسبت الخلايا بجهاز المنبذة المبردة بسرعة 18000 دورة/دقيقة لمدة 160 دقيقة عند درجة حرارة 4 مº.
- جمع الراشح ونبذ بالسرعة نفسها ولمدة ساعة للتخلص من جميع بقايا الخلايا البكتيرية.

- اضيف الاسيتون الى الراشح بنسبة 5 : 1 (حجم/حجم) وترك بدرجة حرارة 4 مº لمدة 24 ساعة للحصول على عديد السكريد الشحمي بشكل دقائق عالقة بيضاء.
- استخدم جهاز المبخر الدوار (Rottary evaporator) بدرجة حرارة 50 مº لغرض الحصول على راسب عديد السكريد الشحمي بشكل سائل كثيف لزج.
- صبت المادة في طبق بتري ونقلت الى الحاضنة بدرجة حرارة 38 مº ولمدة 48 ساعة لغرض تجفيفها، وحفظت لحين الاستعمال.

### 3-2-5-2 التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي

**Partial purification of lipopolysaccharide** استخدمت طريقة Sandford (1979) المحورة من Nuaman (2002) لتنقية عديد السكريد الشحمي كما يلي:

- اذيب عديد السكريد الشحمي في الماء الخالي من الأيونات (Deionized water) بنسبة 60 ملغم/مل، وترك المحلول لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4 مº كي يترسب عديد السكريد الشحمي.
- اعيد اجراء الخطوة السابقة على الراسب المستحصل اربع مرات للحصول على عديد السكريد الشحمي ذي اللون الابيض.
- اذيب عديد السكريد الشحمي في الماء الخالي من الايونات بنسبة 60 ملغم/مل ثم اضيف الاسيتون الى محلول عديد السكريد الشحمي بنسبة 5 : 1 وترك المزيج في درجة حرارة 4 مº لمدة 24 ساعة للحصول على راسب عديد السكريد الشحمي.
- اضيف 20 مل من الاسيتون الى راسب عديد السكريد الشحمي لإزالة الماء منه، ووضع في درجة حرارة ٤ مº لمدة 24 ساعة.
- جفف راسب عديد السكريد الشحمي في درجة حرارة 60 مº لمدة 15 دقيقة، ثم حفظ لحين الاستعمال.

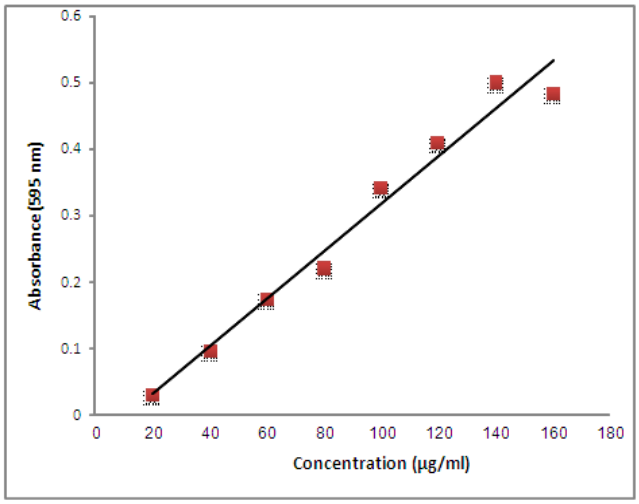
## 3-2-6 التحليل الكيميائي للذيفان الكبدي وعديد السكريد الشحمي

### 3-2-6-1 تقدير كمية البروتينات

اتبعت طريقة Bradford (١٩٧٦) لتقدير كمية البروتين كما يلي:

- حُضّرت تراكيز متدرجة من محلول البومين المصل البقري (٠، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ٨٠، ١٠٠, ١٢٠, ١٤٠ و ١٦٠) مايكروغرام/مل .
- اضيف ٠,٤٥ مل من دارئ الفوسفات الملحي الى ٠,٠٥ مل من كل تركيز من تراكيز البومين المصل البقري المحضرة.

- اضيف 2.5 مل من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 المحضرة كما في الفقرة (3-1-6-5)، مزج الخليط جيدا وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قرئت الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر.
- للحصول على المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري تم رسم العلاقة البيانية ما بين الامتصاصية على الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر وتراكيز البروتين (مايكروغرام/مل) (الشكل 3-1).
- لتقدير تركيز البروتين في مستخلص الذيفان الكبدي أضيف إلى أنبوبة اختبار نظيفة 0.05 مل من النموذج، 0.45 مل من دارئ الفوسفات و2.5 مل من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250، مزج الخليط جيدا وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قرئت الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر وتم تقدير تركيز البروتين باستخدام الانحدار المستحصل من المنحني القياسي للبروتين.




**شكل (3-1) المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري**

### 3-2-6-2 تقدير كمية الكاربوهيدرات

اتبعت طريقة Dudois وجماعته (١٩٥٦) لتقدير كمية الكاربوهيدرات كما يلي:

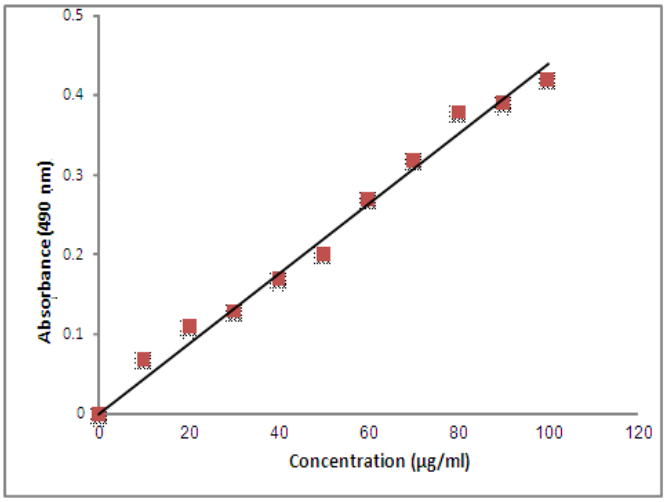
- حُضّرت تراكيز متدرجة من سكر الكلوكوز ( ٠، ١٠،٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، ٦٠، ٧٠، ٨٠، ٩٠ و ١٠٠) مايكروغرام/مل.
- اضيف ١ مل من الفينول ٥% الى كل تركيز من تراكيز السكر المحضرة ورجت الأنابيب جيداً بعدها أضيف 5 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى الخليط وتم رجه جيداً وتركت الأنابيب لتبرد بدرجة حرارة الغرفة، ثم قرئت الامتصاصية على طول موجي 490 نانوميتر.

- وللحصول على المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز تم رسم العلاقة البيانية ما بين الامتصاصية وتراكيز السكر (الشكل 3-٢) وتم استخراج الميل وفقاً للمعادلة التالية: الميل = $\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$

- لتقدير تركيز الكاربوهيدرات في مستخلص الذيفان الكبدي اضيف ١ مل من الفينول ٥% و٥ مل من حامض الكبريتيك المركز الى ١ مل من النموذج وقرأت الامتصاصية كما في اعلاه، وتم حساب تركيز الكاربوهيدرات كما يلي:

تركيز الكاربوهيدرات في النموذج = الامتصاصية للنموذج/ الميل × مقلوب التخفيف

بالمايكروغرام/مل




**شكل (3-2) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز**